

**T. C.
İSTANBUL BİLİM ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI**

**EPIGALLOCATECHİN-GALLAT'IN C6 GLİOMA
HÜCRELERİNE APOPTOTİK ETKİLERİ**

Biyolog Hasan ARSLANYÜREĞİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ



İSTANBUL, 2009

**T. C.
İSTANBUL BİLİM ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI**

**EPIGALLOCATECHİN-GALLAT'IN C6 GLİOMA
HÜCRELERİNE APOPTOTİK ETKİLERİ**

Biyolog Hasan ARSLANYÜREĞİ

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Tuncay ALTUĞ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İSTANBUL, 2009

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
1. ÖZET	7
2. SUMMARY	8
3. GİRİŞ VE AMAÇ	9
4. GENEL BİLGİLER.....	11
4.1. APOPTOZ.....	13
4.1.1. Apoptozun Tanımlanması.....	13
4.1.2. Apoptozun Temel İşlevi ve Amaçları.....	14
4.1.3. Apoptozu Uyarıcı Sinyaller.....	14
4.2. APOPTOZDA HÜCRE İÇİ SİNYAL İLETİMİ VE METABOLİK DEĞİŞİKLİKLER	14
4.2.1. Apoptotik Hücrede Gözlenen Morfolojik Değişiklikler.....	15
4.2.1.1. Yüzey Yapılarının Kaybı:	15
4.2.1.2. Hücre Büzülmesi:	15
4.2.1.3. Kromatin Yoğunlaşması:	15
4.2.1.4. Sitoplazmik Baloncuklar ve Apoptotik Cisimlerin Oluşması:	15
4.3. APOPTOZ VE NEKROZ.....	16
4.3.1. Apoptoz ve Nekroz Arasındaki Farklar	17
4.3.1.1. Fiziksel Farklılıklar :.....	17
4.3.1.2. Morfolojik Farklılıklar :.....	18
4.3.1.3. Biyokimyasal Farklılıklar :	18
4.4. APOPTOTİK HÜCRELERİN TANINMASI VE FAGOSİTOZU	19
4.5. APOPTOZUN GÖRÜLDÜĞÜ OLAYLAR	19
4.6. APOPTOZUN MOLEKÜLER DÜZENLEYİCİLERİ	20
4.6.1. Kaspazlar.....	20
4.6.2. Bcl-2 Ailesi	21
4.6.3. p53	22
4.6.4. Tümör Nekrozis Faktör (TNF) Ailesi.....	22
4.7. APOPTOZ SÜRECİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ	23

4.7.1. Apoptoz Sürecinin Hücre İçi veya Hücre Dışı Uyaranlarla Tetiklenmesine Göre Değerlendirilmesi.....	23
4.7.1.1. Ekstrinsik Yol (Reseptör Aracılı Apoptoz).....	24
4.7.1.2. İntrensik Yol (Mitokondri Aracılı Apoptoz)	24
4.8. APOPTOZ BELİRLEME YÖNTEMLERİ	25
4.8.1. TUNEL	26
4.9. OKSİDATİF STRESS.....	27
5. MATERYAL VE YÖNTEM.....	27
5.1. KULLANILAN KİMYASALLAR VE ÇÖZELTİLER.....	27
5.1.1. EGCG İçin Kimyasal Data.....	28
5.2. KULLANILAN YÖNTEMLER	29
5.2.1. Glioblastoma Multiforme Hücre Hattı (C6).....	29
5.2.2. Hücre Kültürü.....	29
5.3. APOPTOZUN GÖSTERİLMESİ	31
5.3.1. TUNEL Yöntemi	31
5.3.2. Apoptozun Ölçülmesi	33
5.4. İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME.....	33
6. BULGULAR.....	33
6.1. VERİLERİN MİKROSKOBİK ANALİZİ.....	34
6.2. VERİLERİN KIYASLANMASI VE APOPTOTİK SONUÇLAR	43
6.2.1. Doz Etkinliği	44
6.2.2. Zamanın Etkisi	45
6.2.3. Doz ve Zaman İnteraksiyonu	46
7. TARTIŞMA	47
8. SONUÇ.....	50
9. TEŞEKKÜR.....	51
10. KAYNAKLAR	52

SİMGE VE KISALTMALAR

APAF-1	: Apoptotik proteaz aktive edici faktör-1
ANOVA	: Analysis of Varians
ATP	: Adenozin trifosfat
AIF	: Apoptoz indükleyici faktör
APO-1=Fas	: Apoptoz indükleyici reseptör-1
Bcl-2	: B cell lymphoma-2
BrdU	: Bromodeoksiuridin
Bid	: Bcl-2 intercting domain
Bim	: Bcl-2 intercting mediator of cell death
Bcl-2	: Anti-apoptotik protein
Bcl-XL	: Bcl-2 inhibiting apoptosis'in bir üyesi
CARD	: Caspase recruitment domain
Caspase	: Cysteinyll aspartate-spesific protease
c-myc	: Myelocytoma oncogene
DED	: Death effector domain
DIABLO	: Direct IAP binding protein with low pI
DISC	: Death inducing signaling kompleks
EGCG	: Epigallocatechin-gallate
FADD	: Fas assosiated death domain
Flavonoid	: Çaydaki antioksidan maddenin adı
Fas	: TNF ailesinden tip 1 glikolize transmembran reseptörü
Fas-ligand	: Apoptozisi uyaran 40kd'luk tip 2 transmembran proteini
GBM	: Glioblastoma Multiforme (C6 hücre hattı)
iNOS	: 'Inducible' nitrik oksit sentaz
IAP	: İnhibitor of apoptozis
Kateşin	: Çay ile bazı meyve ve sebzelerde bulunan antioksidan
MAPK	: Mitojenle aktive olan protein kinazlar
PCNA	: Proliferating cell nuclear antigen
PARP	: Poly (ADP-ribose) polymerase
PS	: Fosfotidilserin
PUMA	: p53 up-regulated modulator of apoptozis

ROT	: Reaktif oksijen türevleri
SMAC/D (SMAC/DIABLO)	: Second mitochondrial-derived activator
Tein	: Diğer adıyla kafein
Thy-1	: Anti-timosit 1 antijeni
TNF	: Tümör nekroz faktörü
TdT	: Terminal deoxynucleotidyl transferase
TRADD	: TNFR-1 associated death domain
TRAIL	: Tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand
Cdk	: Siklin bağımlı kinaz
Cyc	: Siklin
DMEM	: Dulbecco' nun modifiye eagle medyumunu
FCS	: Fetal sığır serumu
ÜK	: Ürökinaz
TUNEL	: TdT - mediated dUTP- biotin nick end-labeling
XIAP	: X-bağlanmış IAP

Araştırma Projesi No : TBG/0362008

1. ÖZET

Çay (*Camellia sinensis*), dünya çapında yaygın bir içecektir. Yeşil çayın temel bileşeni olan Epigallocatechin-gallate (EGCG) metastaz (yayılma), invazyon (saldırı), angiogenesis (kan damarları oluşumu) ve kanser gelişimini önleme etkileri ile yakından ilişkilendirilmiştir.

Son yıllarda olan araştırmalarda kanser tedavisinde kanserli hücreleri programlanmış hücre ölümüne yönlendirecek maddelerin üzerinde çok durulmuştur. Biz de çalışmamızda EGCG'nin farklılaşma karşıtı bir etki gösterdiği hipotezimizi C6 glioma hücrelerinde programlanmış hücre ölümüne veya apoptoza yönelmeyi sağlayıp sağlamadığına bakarak araştırdık.

Hücrelerimizin EGCG ile muamelesi sonrasında apoptotik oluşumu TUNEL metodu ile gözlemleyip fotoğrafladık. Alan sayımları sonunda elde ettiğimiz verileri ANOVA testi ile karşılaştırdık. ANOVA testinin burada kullanım amacı birden fazla parametreyi ve interaksyonları karşılaştırmaya olanak tanınmasıdır.

24, 48 ve 72. Saatler sonunda 50 ve 100 µg/ml dozlarda EGCG'nin etkilerini incelediğimiz hücre kültürlerimizde apoptoza yönelmenin dozla daha yakından ilişkili olduğunu ve uygulama süresinin de önemli bir faktör olduğunu gördük. 24 saatlik hücre kültürlerimizde 50 ve 100 µg/ml de apoptozun olduğunu, 48. saatte bunun doz artışıyla arttığını, ama en yüksek apoptozun 72. saatte ve 100 µg/ml dozda yani zaman ve doz interaksyonuyla en yüksek oranda etkinin görülebileceğini saptadık.

Sonuç olarak EGCG'nin normal hücrelerle kıyaslanınca tümör hücrelerine karşı seçimli apoptotik etkisi (selective apoptotic effect) onun kanser ile savaşta daha çok araştırılması gereken bir alternatif olabileceğini düşündürmektedir.

Anahtar Kelimeler: Apoptoz, C6 glioma, EGCG, TUNEL yöntemi, Yeşil çay

2. SUMMARY

Tea (*Camellia sinensis*) is a universally widespread beverage. The basic component of green tea, Epigallocatechin-gallate (EGCG), is closely related to its effects in preventing metastasis, invasion, angiogenesis and development of cancer. In recent years, research into cancer treatment has focused heavily on substances that may lead to the programmed elimination of cancer cells.

This study was designed to investigate the effect of green tea catechin; Epigallocatechin gallate (EGCG), on the apoptosis of C6 glioma cell lines. We photographed the apoptotic formation of our cells after treatment with EGCG using the TUNEL method. After counting the cells, we compared the results we had obtained with the ANOVA test. The purpose of using the ANOVA test here was to be able to compare with multiple parameters and interactions.

The cell cultures were measured at periods of 24, 48 and 72 hours for the effects of EGCG at dosages of 50 and 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$. The apoptotic cells were stained using the TUNEL assay. It was observed that the interaction of higher dosage together with longer time periods was the crucial parameter in inducing apoptosis.

Apoptosis occurred in our 24-hour cultured cell lines at dosages of 50 and 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$. The apoptosis increased in our 48-hour cultured cell lines at the same dosages. But the highest rate of apoptosis was observed at the longer time period (72 hours), and at the highest dosage (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

In conclusion, this selective apoptotic effect of EGCG on C6 glioma cell lines renders EGCG worthy of further study to better understand the fundamental action mechanism(s) of tea constituents and the potential usefulness of tea as a highly bioavailable cancer-preventive agent.

Key Words: Apoptosis, C6 glioma, EGCG, TUNEL assay. Green tea

3. GİRİŞ VE AMAÇ

Theaceae familyasının *Camellia sinensis* türünden olan çay dünyada sudan sonra en çok tüketilen içecektir (1). Çay bitkisi filizlerinin; soldurma, kınınma, oksidasyon ve kurutma işlemlerine tabi tutulması ile siyah çay; oksidasyon hariç diğer işlemlerin uygulanması ile de yeşil çay elde ediliyor (2).

Bir çay bardağı yeşil çayda bulunan 100-150 mg kateşinde % 8 Epicatechin (EC), %15 Epigallo-catechin (EGC), %15 Epicatechin-gallate (ECG) ve %50 Epigallocatechin gallate (EGCG) mevcuttur (3). 1 gram yaprak ve 100 ml. çay yaprağı ile sıradan metotla hazırlanmış bir çay içeceği en az 3 dakikalık bir demlenme sonucunda genelde 250–350 mg kadar katı madde içerip bunun yüzdeleri de %30–42 kateşinler ve %3–6 kafein şeklindedir (4).

EGCG en etkili kateşin olup toplam kateşinlerin % 10-50'sini oluşturur. Antioksidan aktivitesi C vitamininden 100 kat ve E vitamininden ise 25 kat fazladır. EGCG'nin biyolojik faydası daha çok oksijen serbest radikallerini temizlemek ile ilişkilendirilmektedir. National Cancer Institute'e (NCI) göre EGCG potansiyel bir kanser önleyici ajandır. Diğer çay kateşinleriyle ve genel olarak polifenoller hücrelerde oluşan serbest radikaller ile oksidatif zarardan koruyan tümörleşme karşıtı fonksiyonel antioksidan moleküllerdir. EGCG kanser genlerinin ekspresyonuyla ilişkili enzimlerin ve hücrelerin sınırsız yaşama yetenekleriyle alakalı olan telomerazı ve DNA metiltransferazı inhibe eder. Bir çok çalışma EGCG gibi serbest radikallerin anti-mutajenik, anti-anjiyojenik, anti-proliferatif ve pro-apoptotik etkileri vardır ve bu etkiler hem in vivo hem in-vitrodadır (4).

Çalışmamızda EGCG'nin etkisini araştırmak için kullandığımız modelde C6 glioma hücreleriyle deneylerimizi gerçekleştirdik. Laboratuvarlar için uygun olan ve küçük hayvanlarda bile uygulanabilen glioma modelleri, malign gliomaların in vivo özelliklerini ortaya koymak ve tedaviye cevaplarını belirlemek için günümüzde sıklıkla oluşturulmaktadır. Primer beyin tümörlerinin %60 kadarını gliomalar oluştururlar (5).

C6 glioma tümör hattı metil nitrozüreye ardışık şekilde maruz kalmış Wistar-Furth sıçanlarında oluşan beyin tümörleri kültürlerinden elde edilmektedir (6).

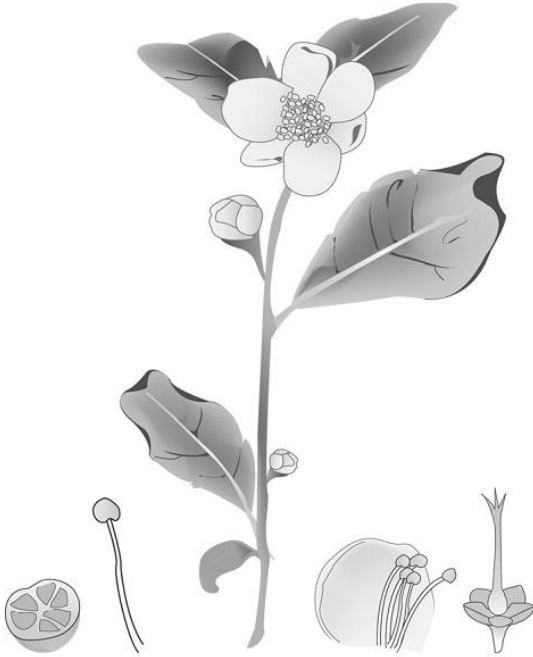
Beynin kendi dokularından oluşan yani primer beyin tümörlerinden en sık görüleni (%30) glia hücrelerinden köken alan gliomalardır (Glioblastoma multiforme). Bunlar

santral sinir sistemi tümörlerinin en büyük grubunu oluştururlar (%50). Birçok glioma türü vardır. Bunlardan biri olan glioblastoma (Astrositoma) yıldız şeklindeki glia hücrelerinden köken alır. Erişkinlerde daha çok serebrumda ortaya çıkarken çocuklarda beynin her üç bölümünde de görülebilirler. Beyin tümörlerinin neden olduğu kesin olarak bilinmemektedir. Ama bazı risk faktörleri, bir kişide beyin tümörü gelişmesi olasılığını artırmaktadır (erkek cinsiyet, yaş, ırk, radyasyon ve diğer zararlılara maruz kalmak) (7).

Bu çalışmamızın amacı kanser hücrelerini apoptoza indükleyen EGCG'nin farklı dozlarda ve zaman aralıklarında etkisini C6 glioma hücreleri üzerinde inceleyerek doz ve zaman interaksyonu ilişkisi kurabilmektir. Bunu da glioblastoma multiforme hücrelerinde TUNEL yöntemiyle görünür kıldığımız apoptotik hücrelerden elde ettiğimiz (Apoptotik İndeks) sonuçlarla gerçekleştirmeyi hedefledik.

4. GENEL BİLGİLER

Çin mitolojisine göre imparator Shen Nung çayı M.Ö. 2737'de ilk keşfeden kişi. Yeşil çayın sağlığa yararları ile ilgili ilk bilgi M.Ö. 2700'lere dayanır. İlk bilimsel yayın ise M.S. 1211 yılındaki Japon rahip Eisai tarafından yazılan `Çay içerek sağlık nasıl korunur` kitabıdır. Yeşil çayın tedavi edici etkileri 16. yüzyılda çay özütüyle ateş, baş ağrısı, mide ağrısı ve kesiklerin ağrısını dindirmeye çalışan Avrupalılarca keşfedilmiştir (8).

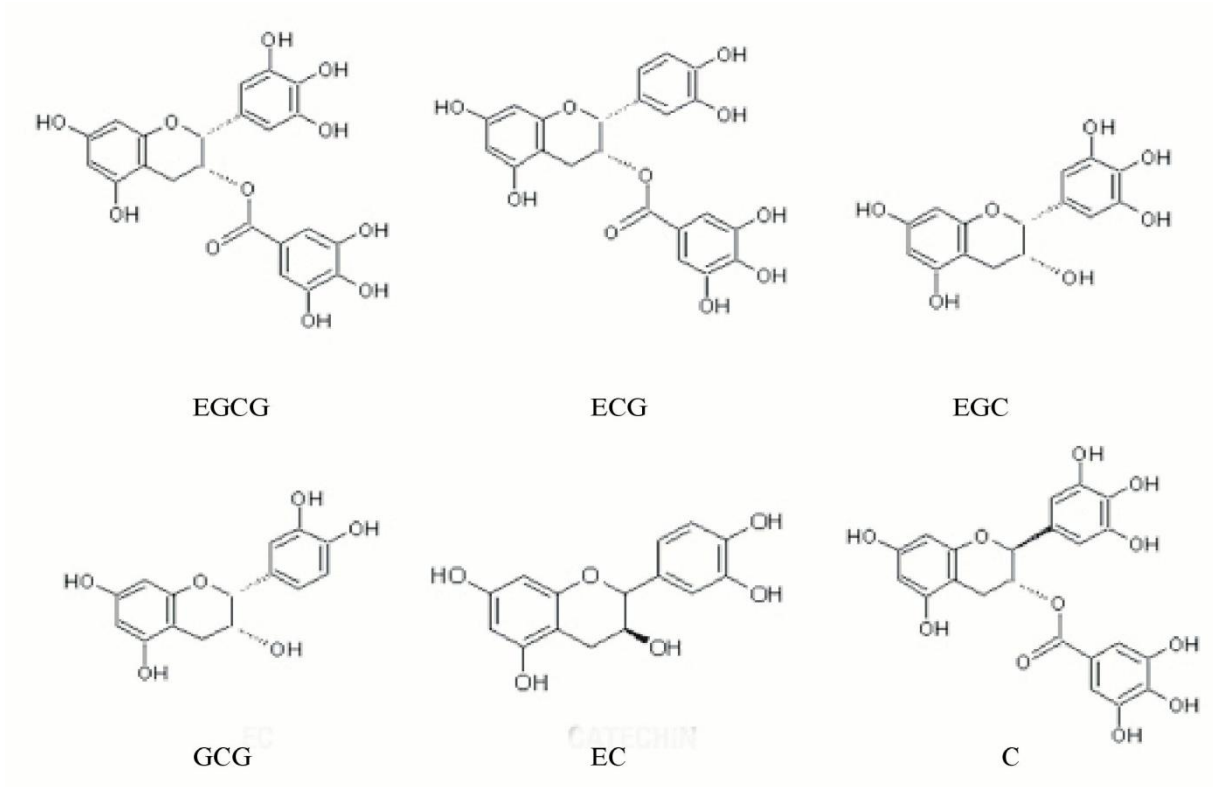


Resim 1: *Camellia sinensis* (Çay bitkisi) morfolojisi (9)

KATEGORİ	KARŞILIĞI
Alem	Plantae
Alt alem	Tracheobionta
Üst bölüm	Spermatophyta
Bölüm	Magnoliophyta
Sınıf	Magnoliopsida
Alt sınıf	Dilleniidae
Takım	Theales
Aile	Theaceae
Cins	Camellia L.
Tür	Camellia sinensis (L.)

Tablo 1 : Çay bitkisinin sınıflandırılması (10)

Yeşil çayda yer alan polifenoller : flavanoller, flavandioller, flavonoidler ve fenolik asitlerdir. Genellikle yeşil çay polifenollerinden flavanoller, kateşinler olarak da bilinirler. Bu kateşinler şunlardır: Catechin (C), Epicatechin (EC), Gallocatechin (GC), Epigallocatechin (EGC), Catechingallate (CG), Epicatechin-gallate (ECG), Gallocatechin-gallate (GCG) ve Epigallocatechin gallate (EGCG). İnanılan ise kansere etkin; çayın içeriğindeki polifenol bileşenleri sayesinde olduğudur. Yeşil çay polifenollerin antioksidan etkisi şu sıraya göre artmaktadır: $EC < ECG < EGC < EGCG$ (11).



Resim 2 : Kateşinlerin halkasal yapısı (12)

Siyah çayın üretimi esnasında yukarıda gösterilen polifenollerin çoğu teflavin formuna okside ve polimerize olur. Siyah çaya kırmızı rengini veren durum da budur (11).

Yeşil çayla ilgili şu ana kadar ki çalışmaların çoğu ECGC`nin hücre proliferasyonu ya da hücre ölümü üzerine etkilerine odaklanmıştır. EGCG`nin insan prostat kanseri hücre serilerinde (13), insan epidermoid karsinoma A431 hücrelerinde (14), meme karsinoma MCF-7 hücreleri (15), melanoma hücreleri (16) ve pankreas kanser hücreleri (17) gibi birçok insan hücre hattında apoptozu teşvik edici etkileri gösterilmiştir.

EGCG'nin antioksidan etkinlikleri ise aromatik halkalara ve hidroksil gruplarına bağlıdır. Böylece serbest radikalleri yakalar ve nötralize eder. Tümör başlangıcı ve yayılmasının biyokimyasal işaretçileri olan apoptoz indüksiyonu, hücre replikasyonunun inhibisyonu, neoplazmanın gelişimini ve büyümesini baskılar. EGCG proteolitik bir enzim olan ürokinazı da inhibe eder. Ürokinaz kanserli hücrelerin metastaz yapmak için kullandıkları enzimdir. EGCG ve ECG mellatoproteinaz-2 (MMP-2) (gelatinaz-A olarak da bilinir) ve metalloproteinaz-9 (MMP-9) (gelatinaz-B) u inhibe eder. Bu iki enzim tümör invazyonu ve metastazında rol almaktadır. EGCG'nin hem anti-matriks metalloproteinaz hem de anti-anjiyogenesis etkisi bulunmaktadır (18). EGCG'nin insandaki etkileri antioksidan (19,20,21), anti-mutajenik, anti-karsinojenik (22) ve anti-HIV (23) aktivitededir.

Çay polifenollerinin bu özellikleri onları kanser oluşumunun başlama ve ilerleme safhalarına karşı etkili yapar (23).

Diğer önemli bir nokta da yeşil çaydaki ana yapıları benzer ama yan zincirlerinde farklı grupları olan diğer kateşinlerin anti-kanser etkisinin de farklı olmasıdır. Bunun anlamı kateşinlerin anti-kanser etkisinin yapıya göre spesifik olduğudur (13).

EGCG ile muamele telomerazın kısalması ve telomeraz aktivitesinin azalması ile sonuçlanmıştır. Bu sonuç bize telomeraz inhibisyonunun EGCG sebebi bir durum olduğunu gösterir. Telomeraz hedefli bu tip sonuçlar bize kanser tedavileri ile ilgili yeni fikirler verebilir (15).

4.1. APOPTOZ

4.1.1. Apoptozun Tanımlanması

apo-TOE-sis kelimelerinden kökenlenmekte olup eski Yunanca'da "sonbaharda yaprak dökümü" anlamına gelmektedir. Hücrelerde normal gelişim sırasında meydana gelen ölüm 1842 yılında Vogt tarafından tanımlanmıştır (24) .

Programlanmış hücre ölümü terimi olarak ilk kez 1965 yılında kullanılmıştır. Apoptoz terimi 1972 yılında Kerr, Wyllie ve Currie tarafından programlanmış hücre ölümünü tanımlamak için kullanıldı. Kerr, fizyolojik olarak ölen hücrelerin çekirdeklerinde yoğunlaşmış kromatin parçalarını gözlemlemiş ve organellerin iyi korunduğunu fark ederek bu olayı büzüşme nekrozu olarak adlandırmıştır (25).

1993 yılında Cohen yüksek dozda kullanılan steroidlerin timus hücreleri üzerine etkilerini incelemiş ve timus hücrelerinin direkt olarak apoptozu seçmediğini, hücre ölümüne neden olacak genleri oluşturarak hücreleri apoptoza yönlendirdiğini bildirmiştir (26). Böylece apoptozun genler tarafından düzenlenen bir hücre ölümü olduğu ortaya çıkmıştır (27).

4.1.2. Apoptozun Temel İşlevi ve Amaçları

Komşu hücrelere hasar vermeden ve onları kötü yönde etkilemeden ve iz bırakmadan hedeflenen hücrenin yok edilmesidir. Hücre proliferasyonu nasıl ki mitoz ile belirlenmekte ise belirli bir dokuda olması gereken hücre sayısı da apoptoz ile belirlenir. Bu şekilde:

- a) Embriyo gelişimi ve başkalaşım (metamorfoz) sırasında olduğu gibi, gelişimi sürecinde organizmaya şekil verir.
- b) Organizmanın toplam hücre sayısı düzenlenir.
- c) Tümör hücreleri, virüsle kontamine olmuş hücreler, kendi başına buyruk hale gelen ve kendine zarar veren immün hücreler (ki bunlar otoimmün hastalıklara yol açabilir) gibi istenmeyen ve tehlikeli hücreler ortadan kaldırılır ve bunlara karşı savunma oluşturulur (28).

4.1.3. Apoptozu Uyaran Sinyaller

- a) Hücre dışı: Hormonlar, büyüme faktörü
- b) Hücre içi: İyonize radyasyon, viral infeksiyon, serbest radikallerden dolayı meydana gelen oksidatif hasar (29).

4.2. APOPTOZDA HÜCRE İÇİ SİNYAL İLETİMİ VE METABOLİK DEĞİŞİKLİKLER

Hücre içi sinyal iletiminde yaygın olarak kullanılan Kalsiyum (Ca^{++}) apoptozda da rol oynar. Hücre içindeki Kalsiyum iyonlarının miktarındaki artış hücreyi apoptoza götürmektedir (30). Sitoplazmadaki Kalsiyum iyonu miktarındaki hafif artış, c-myc, c-fos,

ısı şok proteinlerini harekete geçirir ve hücrenin apoptoza gitmesine neden olur. Kalsiyum; adenilat siklazları aktive ve inhibe etme yeteneğine sahiptir. c-AMP ve protein kinazlar üzerinden sinyal iletimini etkiler (31). Sitoplazmada artan Kalsiyum inaktif durumdaki Kalsiyum bağımlı proteazları ve nükleazları aktifleştirerek sitoplazmik proteinlerin parçalanmasına ve apoptoza özgü internükleozomal DNA kırıklarına neden olur (32). Kalsiyum iyonu, inaktif durumdaki endonükleaz, proteaz, transglutamaz, fosfolipaz gibi latent enzimleri aktive ederek apoptoza neden olur (33).

4.2.1. Apoptotik Hücrede Gözlenen Morfolojik Değişiklikler

4.2.1.1. Yüzey Yapılarının Kaybı:

Apoptoza uğrayan hücrenin komşu hücrelerle bağları kesilir. Hücre yüzeyindeki mikrovillüsler ve diğer hücrelerle yaptıkları özel bağlar ortadan kalkar, hücre yüzeyi yuvarlaklaşır (34).

4.2.1.2. Hücre Büzülmesi:

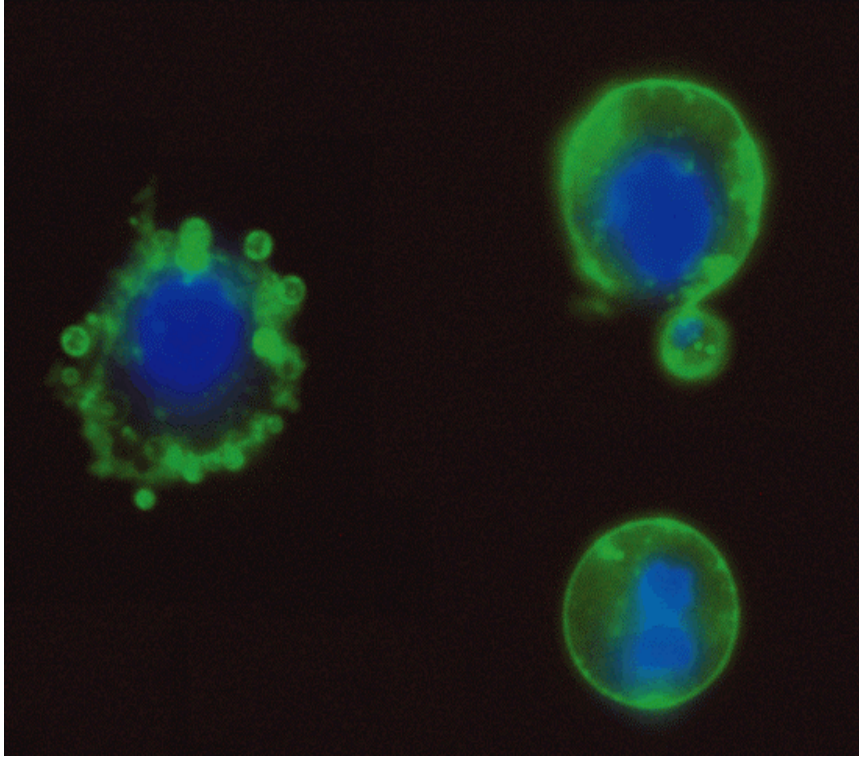
Apoptotik hücre komşu hücreye göre daha küçük ve sitoplazması daha yoğundur. Endoplazmik retikulum dışında diğer hücre organelleri yapılarını korur. Sitoplazma yoğunluğu arttığı için organeller kalabalık görünür. Hücre zarı sağlam olduğundan nekrozda olduğu gibi bir inflamatuvar reaksiyon gözlenmez (35).

4.2.1.3. Kromatin Yoğunlaşması:

Genellikle çekirdek büzülür. Kromatin çok yoğun bir hale gelir ve parçalar halinde bir araya toplanır (30). Çekirdek porları seçilemez. Çekirdek şekli düzensizleşir ve ileri evrede küçük çekirdek parçalarına bölünür. Çekirdekçik genişler ve granülleri kaba granüller halinde dağılır (35).

4.2.1.4. Sitoplazmik Baloncuklar ve Apoptotik Cisimlerin Oluşması:

Hücrede önce yüzeye doğru tomurcuklanmalar olur. Bunlardan bazıları sitoplazma parçacıkları içeren ve sıkı biçimde paketlenmiş organelerden oluşan zarla sarılı apoptotik cisimlere dönüşür (88). Apoptoz için morfolojik değişimler hücre büzülmesi, kromatin yoğunlaşması, hücre membran tomurcuklanması olurken fosfotidilserin açığa çıkar. Sağlıklı hücrelerde plazma membranının içinde bulunan fosfotidilserin apoptotik hücrelerde plazma membranının dış yüzünde bulunur ve fagositik hücreler için sinyal görevi görür (36).



Resim 3: Hücre yüzeyine doğru yer değiştiren fosfotidilserin (37)

4.3. APOPTOZ VE NEKROZ

Organizma sürekli bir denge halindedir. Hücre bölünmeleri sonucu yeni hücreler oluşurken, varolan hücrelerin bir kısmı hücre ölümü ile ortadan kaldırılmakta ve böylece

denge korunmaktadır. Ama hücreleri ortadan kaldırmanın tek yolu apoptoz değildir. Hücre ölümünün iki tipi vardır, bunlar apoptoz ve nekrozdur.

Apoptozun gerçekleşebilmesi için yüksek ATP seviyelerine ihtiyaç vardır. Hücre içi ATP seviyesi hücrenin apoptozla mı veya nekrozla mı öleceğine yön verir. Eğer hücre ciddi olarak yaralanırsa apoptotik yol için gerekli olan enerjiyi sağlayamayacak ve nekroz ile ölecektir (38).

NEKROZ	APOPTOZ
İskemi	Büyüme faktörü eksikliği
Hipertermi	Hücre yaşlanması
Hipoksi	HIV
Litik viral enfeksiyon	Kanser ilaçları
Toksik maddelerin yüksek konsantrasyonları	Yüksek doz glukokortikoid
Şiddetli oksidatif stres	Fas veya TNFR-1 reseptörlerinin aktivasyonu
	Sitotoksik T lenfositler
	Çok şiddetli olmayan oksidatif stress

Tablo 2 : Nekroz ve apoptoz yol açan nedenlerin karşılaştırılması (38)

4.3.1. Apoptoz ve Nekroz Arasındaki Farklar

4.3.1.1. Fiziksel Farklılıklar :

- 1- Nekroz komşu hücre gruplarını etkiler (39), oysa apoptozda sadece hücrenin kendisi etkilenir (40).
- 2- Nekroz fizyolojik olmayan uyaranlarla başlar (36), apoptoz fizyolojik uyaranla da başlayabilir (örnek: hormonal dengenin bozulması) (34).
- 3- Nekroza uğrayan hücre, çevreye yaydığı kemotaktik maddeler aracılığı ile çağrılan makrofajlar tarafından fagosite edilir (36). Apoptozu uğrayan hücre ise çevreye kemotaktik madde yaymaz; yanında bulunan epitel hücreleri veya makrofajlar aracılığı ile fagositoza uğrar. Nekrozda inflamatuvar cevap vardır, apoptozda ise yoktur (34).

4.3.1.2. Morfolojik Farklılıklar :

- 1- Nekrozda zar bütünlüğü bozulur (30), apoptozda zarda kabarcıklar görülür fakat asla zar bütünlüğü bozulmaz (40).
- 2- Nekroz sitoplazma ve mitokondride şişme ile başlar (39), apoptozda ise sitoplazma büzülme ve çekirdek yoğunlaşması görülür (30).
- 3- Nekroz total hücre parçalanması ile sonlanır, oysa apoptoz hücrenin daha ufak fragmanlara dönüşmesi ile sonlanır (apoptotik cisimler) hücre tümüyle dağılır (39).
- 4- Nekrozda hücre zarında vezikül oluşumu yoktur; oysa apoptozda zara bağlı veziküller oluşur (27).
- 5- Nekrozda organellerin devamlılığının bozulması mevcut iken, apoptozda (30); apoptozu başlatan bcl-2 gen ailesinin ürettiği por oluşturan proteinlerin etkisi ile organeller bütünlüğünü korur, ancak delikli bir yapıya kavuşur (27).

4.3.1.3. Biyokimyasal Farklılıklar :

- 1- Nekrozda iyon dengesi kaybolur, apoptozda ise sıkı bir şekilde kontrol edilen enzimatik olaylar mevcuttur (34).
- 2- Nekroz enerjiye ihtiyaç duymaz, pasif bir olgudur ve +4°C'de bile gerçekleşebilir. Apoptoz ise enerji gerektiren aktif bir olgudur ve +4° C'de gerçekleşemez (27).
- 3- Agaroz jel elektroforezi yapıldığında, nekroz sırasında DNA'nın rastgele sindirimi mevcuttur (34). Oysa apoptozda rastgele olmayan, mono-oligonükleozomal parçalanma mevcuttur. Bu da agaroz jel elektroforezde apoptoz için karakteristik "*ladder pattern*" denilen merdiven şeklinde kırılmalar meydana getirir (41).
- 4- Nekroz sırasında hücre ölümünün geç bulgusu; postlitik DNA parçalanması vardır (DNA, hücre bütünlüğü bozulmadan önce parçalanır). Ayrıca apoptozda mitokondri tarafından sitoplazmaya birçok faktör salınımı mevcuttur (sitokrom-c v.b.) (41).
- 5- Nekroz sırasında nonspesifik zar parçalanması olurken, apoptozda zar asimetrisinde değişiklikler olur (örn: fosfotidilserin zarın sitoplazmik yüzünden ekstraselüler yüzüne doğru yer değiştirir). Bu değişiklik apoptotik hücrenin inflamatuvar reaksiyon oluşturmada lokal hücrelerce tanınıp, fagosite edilmesini sağlar (27).



Tablo 3: Hücrenin apoptozla ilgili bölgeleri

4.4. APOPTOTİK HÜCRELERİN TANINMASI VE FAGOSİTOZU

Ölüm mekanizması nasıl olursa olsun, ölü hücrelerin ortadan kaldırılması gerekmektedir. Gerek nekroz gerekse apoptozda ölü hücreler fagositozla ortadan kaldırılır. Apoptoz sonunda çevresi plazma membranı ile çevrili içinde hücre parçalarının bulunduğu apoptotik cisimcikler oluşur. Bu apoptotik cisimcikler, hücrelerarası alana dağılırlar veya lümene dökülürler. Apoptotik cisimciklerin iç membranında bulunan fosfolipid tabakası dış tarafa doğru yer değiştirerek plazma membranının dış katmanlarında fosfatidilserinin açığa çıkmasını sağlarlar. Fosfatidilserinin, fagositozun oluşması için adeta `beni ye` sinyali oluşturur. Apoptotik hücrelerin fagositoz ile temizlenmeleri, nekroz ürünlerinin aksine anti-inflamatuar sitokinlerin üretimi ve proinflamatuar sitokinlerin baskılanması ile karakterizedir. Böylece apoptotik hücrelerin temizlenmesi hızlı, etkin ve sessiz olarak gerçekleşir (38).

4.5. APOPTOZUN GÖRÜLDÜĞÜ OLAYLAR

Bazı organların biyolojik gelişimleri esnasında apoptoza rastlamak mümkündür. Apoptoz ayrıca her türlü neoplastik oluşumda; hem büyüme hem gerileme döneminde görülebilir (42). Hafif şiddette fiziksel ve toksik uyanlara maruz kalan dokularda da apoptoz görülür (Örnek düşük doz sitotoksik ilaçlar, iyonize radyasyon, hafif travma) (31).

Bu anlamda apoptoz spesifik bir uyarana maruz kalan hücrenin, bu uyarıya aktif olarak verdiği düzenleyici bir yanıtıdır (39). Apoptozlu hücreler sağlıklı doku içinde dağılmış şekilde bulunur (30). Apoptozun görüldüğü başlıca olaylar şunlardır:

a-Embriyogenez ve metamorfoz sürecinde programlı hücre yıkımı (fetus implantasyonu, organogenez ve gelişim sürecinde yaşanan involüsyon) (43)

b-Erişkinde hormona bağımlı involüsyon (menstrüel siklusa endometriyum hücrelerinin yıkımı, menopozda folikül atrezisi, laktasyonun kesilmesinden sonra meme bezlerinin rejenerasyonu) (30)

c-Sürekli çoğalan hücre gruplarında hücre sayısının dengelenmesi amacı ile hücre azaltılması (barsak kripta epitelleri) (30)

d-İmmun hücrelerin seçimi (hem B hem de T hücrelerinin sitokin deplesyonundan sonra ve timusun gelişimi sırasında otoreaktif T hücrelerinin ortadan kaldırılması) (27)

e- Tümörlerde hücre ölümü (hem büyüme hem de regresyon aşamasında) (27)

f- Hormonlara bağlı dokularda patolojik atrofi (31)

g-Sitotoksik T hücreleri ile oluşturulan hücre ölümü (otoimmün hastalıklar) (27)

h-Çeşitli etkenlerle oluşan hücre ölümü (radyasyon, antineoplastik ilaçlar, hipertermi, hipoksi, travma) (44)

4.6. APOPTOZUN MOLEKÜLER DÜZENLEYİCİLERİ

Apoptozun her basamağı bir çok proteinin birlikte çalışmasını gerektirir. Bu proteinler, kaspazlar, Bcl-2 ailesi, p53 ve TNF ailesidir. En etkili proteinazlar kaspazlardır (45).

4.6.1. Kaspazlar

Sistein proteinazlarıdır ve aspartik asitten sonraki peptit bağımlı kırarlar. Çoğu apoptozda görevli 14 farklı kaspaz tanımlanmıştır. Kaspazlar, tek polipeptit zinciri halinde sentez edilirler ve üç tane bölgeleri vardır: efektör ölüm (death effector domain: DED), kaspaz toplama (caspase recruitment domain: CARD) ve ölüm bölgeleridir (death domain: DD) (45).

Tüm kaspazlar hücre içinde inaktif olarak bulunurlar ve proteolitik işlemlerle kırılarak aktif olurlar. İnaktif kaspazların aktivasyonu ; granzim B aracılığıyla, sitotoksik T hücre granüllerinde bulunan aspartata özgü serin proteinazlar aracılığıyla veya aktif olan kaspaz proteininin inaktif olan kaspaz ile etkileşimi sonucu gerçekleşebilir. Kaspazlar, yapısal özelliklerine ve fonksiyonlarına göre şu üç grupta sınıflandırılırlar; inflamatuvar kaspazlar olarak adlandırılan grup I kaspazlar (kaspaz 1, kaspaz 4, kaspaz 5), başlatıcı kaspazlar olarak bilinen grup II kaspazlar (kaspaz 2, kaspaz 8, kaspaz 9, kaspaz 10) ve efektör kaspazlar olarak adlandırılan grup III kaspazlar (kaspaz 3, kaspaz 6, kaspaz 7) (45).

Ölüm reseptörleri aracılığıyla tetiklenen apoptotik sinyal, kaspaz 8 veya kaspaz 10 gibi başlatıcı kaspazların aktivasyonunu sağlarken mitokondriyal apoptotik sinyaller kaspaz 9'u aktif hale getirir. Daha sonra bu kaspazlar diğer kaspazları aktifleştirerek proteolitik bir kaskada neden olurlar. Bu kaskad sonunda efektör kaspazlar olan kaspaz 3, 6 veya 7 aktive olur. Bu aktivasyon, nükleaz inhibitörü, hücre iskeleti ve önemli hücre proteinlerinde bölünmeye yol açarak DNA'da parçalanmaya ve tipik morfolojik değişikliklere neden olur (45).

Yaşayan hücrelerde kaspaz aktivasyonu apoptoz inhibitör proteinleri (IAP) adı verilen hücre proteinleri aracılığıyla kontrol altında tutulurlar (46). İnsanlarda altı tane IAP tanımlanmıştır; NAIP, c-IAP1 (HIAP2), c-IAP2 (HIAP-1), XIAP, survivin ve BRUCE (47).

4.6.2. Bcl-2 Ailesi

Bcl-2 proteinleri apoptozis regülasyonunda; hücre yüzeyi ile hücre içi ölüm sinyalleri arasında denetim noktası olarak, apoptozom oluşum safhasında ve kaspaz kaskadının aktivasyonunda önemli rol oynar (48,49).

Bcl-2 ailesi iki düzineden daha fazla üyeye sahiptir ve birbirine zıt etkileri olan iki gruptan oluşur. Bu gruplardan biri apoptozu tetikleyici (en iyi olarak bilinenler: bax, bid, bcl-Xs, bad, bim, bak, bok, PUMA, NOXA), diğeri ise apoptozu baskılayıcı (en iyi olarak bilinenler: bcl-2, bcl-X1, Mcl-1) etkiye sahiptir. Bcl-2 ailesinin üyeleri BH1, BH2, BH3, BH4 bölgelerinden en az birini içerirler (38).

Apoptozu tetikleyen üyeler kendi aralarında; BH1, BH2, BH3 bölgelerinden her üçünü bulunduranlar (Bax, Bak) ve sadece BH3 içerenler (bid, bad, bim, PUMA, NOXA) olmak üzere ikiye ayrılırlar. Apoptozu baskılayan üyelerin hepsi bölgelerin dördüne sahiptirler. Ölüm sinyali olmadığı zaman Bcl-2 proteinleri hücre içinde ayrı kompartmanlarda bulunurlar. Ölüm sinyali alındığı zaman, apoptozisi indükleyen üyeler değişime uğrarlar, daha sonra mitokondrinin dış membranına entegre olurlar ve mitokondriden apoptozisi başlatıcı bir faktör olan sitokrom c'nin salıverilmesine neden olurlar. Bu olaylar gerçekleşirken apoptozu baskılayan üyeler ise inaktif durumdadırlar (50).

4.6.3. p53

p53; apoptozu tetikleyen birçok farklı gen ürününün sentezini artıran transkripsiyon faktörüdür. p53'ün sentezlerini arttırdığı apoptozu tetikleyen gen ürünleri; hücre döngü gelişim inhibitörleri, p53 aktivitesini kontrol eden düzenleyiciler, oksidatif stres ve endoplazmik retikulum stres mediatörleri, ölüm reseptör sinyal yolunun komponentleri ve bcl-2 ailesinin apoptozu tetikleyen proteinleridir. p53 aynı zamanda transkripsiyondan bağımsız olarak da apoptozu tetikleyebilir. p53, hücrede bir şekilde DNA hasarı olduğu zaman hasar onarılabilecek düzeyde ise hücre siklusunu G1 fazında durdurur ve hücreye DNA tamiri için zaman kazandırır. Eğer DNA hasarı tamir edilemeyecek kadar büyükse Bax'ın sentezini arttırarak apoptozu tetikler (51).

4.6.4. Tümör Nekrozis Faktör (TNF) Ailesi

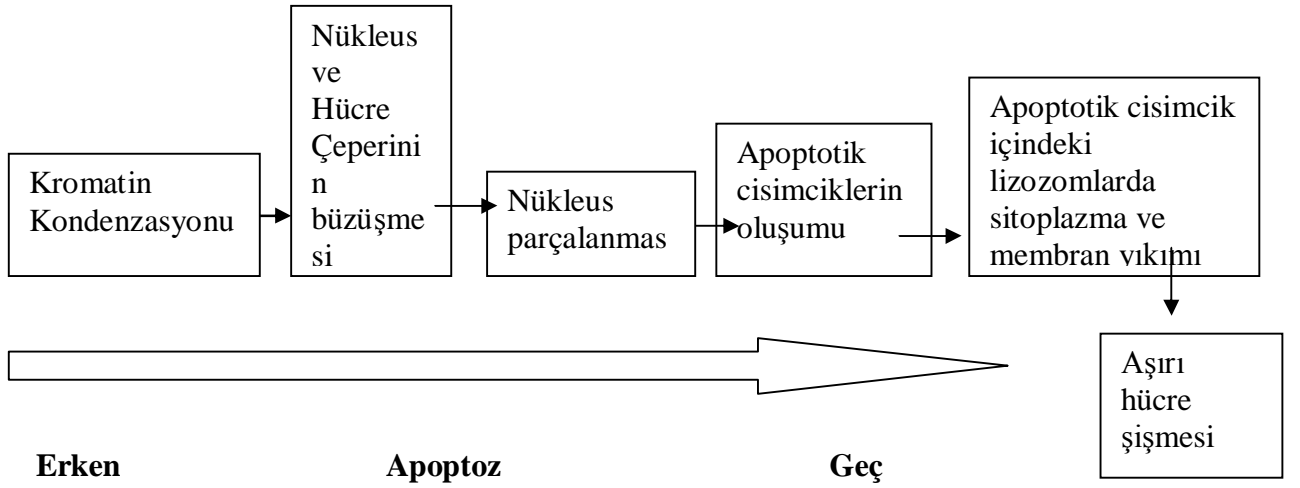
TNF, bir sitokindir ve apoptozis, hücre proliferasyonu, immünomodülasyon, inflamasyon, alerji ve otoimmün hastalıklara aracılık eder. TNF, transmembran proteini olarak sentez edilir. TNF'nin membrana entegre formu (mem-TNF) proteolitik bölünme ile soluble TNF halini alır.

TNF, biyolojik fonksiyonlarını iki farklı reseptör aracılığıyla gerçekleştirir; tip 1 (TNF-R1) ve tip 2 (TNF-R2) . Hücrenin ölüm sinyalinin aktarımı, TNF-R1'in sitoplazmik ölüm bölgesi aracılığıyla gerçekleşir. Bu durum kaspaz 8 aktivasyonuna veya mitokondri bağımlı döngünün aktivasyonuna, sonuç olarak da apoptozu neden olur (52).

4.7. APOPTOZ SÜRECİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Apoptoz süreci, hücre ölümüne neden olan uyarı ile başlar ve enerji bağımlı kaskad ile sona erer. Bu süreç, 4 faz halinde özetlenebilir:

1. Erken veya başlangıç fazı: Apoptoz, apoptotik cevaba neden olan uyarı ile başlar. Apoptotik cevap, hücre dışı bir sinyalin hücre yüzey reseptörlerini uyarmasıyla tetiklenebileceği gibi, ilaçlar, radyasyon veya toksinlerin neden olduğu hücre içi uyarılar ile de tetiklenebilir,
2. Sinyal transferi fazı: Sinyal veya metabolik durumun algılanması ve bu algılanan sinyal veya metabolik durumun hücre ölüm efektör sistemine iletilmesi,
3. Efektör faz: Kaspaz sisteminin aktivasyonu (53).



Tablo 4: Apoptozda oluşan erken ve geç morfolojik değişiklikler (54)

4. Hücre ölümünden sonraki faz: Hücrelerin kromatin veya DNA'larının sindirimini ve ölen hücrelerin fagositik hücreler tarafından tanınarak yok edilmelerini içerir (53).

4.7.1. Apoptoz Sürecinin Hücre İçi veya Hücre Dışı Uyaranlarla Tetiklenmesine Göre Değerlendirilmesi

Hücreler, hücre içi veya hücre dışı çevrede meydana gelen büyüme faktörü eksikliği, hücre yaşlanması, HIV, kemoterapi, radyasyon, yüksek doz glikokortikoid, Fas ve TNFR-1 reseptörlerinin aktivasyonu ve oksidatif stres gibi hücre ölüm uyaranları ile tetiklenerek iki ayrı yol ile apoptoza giderler. Bu ana yollardan birisi ekstrinsik yol; hücre dışı ölüm uyaranları ile tetiklenen reseptör aracılı apoptoz, diğeri ise intrinsik yol; hücre içi uyaranlar ile tetiklenen mitokondri aracılı apoptozdur (38).

4.7.1.1. Ekstrinsik Yol (Reseptör Aracılı Apoptoz)

Ekstrinsik yolda apoptoz, hücre ölüm reseptörleri olan Fas ve TNF-R1'in kendi ligandları ile etkileşime girmesi sonucu başlar. Fas ligandı (Fas L), sitotoksik T lenfositlerde ve doğal öldürücü (natural killer) hücrelerde bulunur (55).

TNF-R1'in ligasyonu, TNF-R1'e TNF'nin bağlanması ile gerçekleşir (55). Fas ve TNF-R1 kendi ligandlarıyla bağlandıklarında ölüm uyarısı almış olurlar. Fas reseptörü, birbirine komşu iki Fas ligandının birbirleriyle bağlanması sonucu trimer kompleks halinden hexamer kompleks haline dönüşür. Daha sonra, Fas reseptörü kendisinin intrasitoplazmik ölüm bölgesi olan FADD (Fas associated death domain) ile, TNF-R1 ise kendi intrasitoplazmik ölüm bölgesi olan TRADD (TNF-R1 associated death domain) ile etkileşime girer. Böylece ölüme sebep olan sinyal kompleksi (death-inducing signalling complex: DISC) oluşur. Bu kompleks, prokaspaz 8'in efektör ölüm bölgesi (death effector domain: DED) ile birleşerek prokaspaz 8'in aktif formu olan kaspaz 8'in oluşumuna neden olur. Kaspaz 8; ya prokaspaz 3'ü aktive ederek hücre ölümüne sebep olur ya da Bcl-2 ailesinin üyesi olan Bid'in c-terminal bölgesini keserek aktif formu olan tBid'in oluşmasına ve böylece apoptozun intrinsik yola doğru ilerlemesine neden olur. Hücreler, bu iki yoldan birisine daha fazla yatkındırlar. Tip 1 hücreler (lenfositler), kaspaz 3 aktivasyon yolunu tercih ederken, Tip 2 hücreler (hepatositler), intrinsik yola doğru ilerlemeyi tercih ederler (55).

4.7.1.2. İntrensik Yol (Mitokondri Aracılı Apoptoz)

Sitotoksik ilaçlar, oksidatif stres, iyonize radyasyon, DNA hasarı, büyüme faktör eksikliği gibi nedenlerle oluşabilen ölüm sinyali, Bcl-2 ailesinin sadece BH3 bölgesini içeren üyeleri (bid, bad, bim, PUMA, NOXA) tarafından mitokondriye taşınır .

İntrensik yolun en önemli bölümü, mitokondri dışı membran geçirgenliğinde oluşan artıştır (MOMP: mitochondrial outer membrane permeabilization) (56).

Hangi yol ile olursa olsun ölüm sinyalinin, MOMP oluşumunu gerçekleştirebilmesi, mitokondriden apoptozun aktivasyonuna neden olan başta sitokrom-c olmak üzere Smac/diablo (second mitochondria-derived activator of caspase/direct IAP binding protein with low pI), AIF (apoptosis inducing faktor), endonükleaz G ve Omi (homologue of bacterial HtrA) gibi maddelerin salınımına neden olur .

Sitokrom-c; Apaf-1 (apoptosis protease activating factor-1) ve pro-kaspaz 9'a bağlanarak apoptozom adı verilen oligomerik Apaf-1 kompleksi (Apaf-1 + sitokrom-c + ATP + Prokaspaz 9)'nin oluşumunu sağlar. Aktifleşen kaspaz 9, pro-kaspaz 3'ü aktive eder. Aktif kaspaz 3, kaspazla aktifleşen deoksiribonükleaz inhibitörünü (ICAD: inhibitor of caspase- activated deoxyribonuclease) inaktif hale getirir .

Böylece ICAD'ın başladığı kaspazla aktifleşen deoksiribonükleaz (CAD: caspase-activated deoxyribonuclease) serbestleşir. CAD, apoptozun karakteristik bulgularından olan kromatin yoğunlaşmasına ve oligonükleozomal DNA parçalanmasına neden olur .

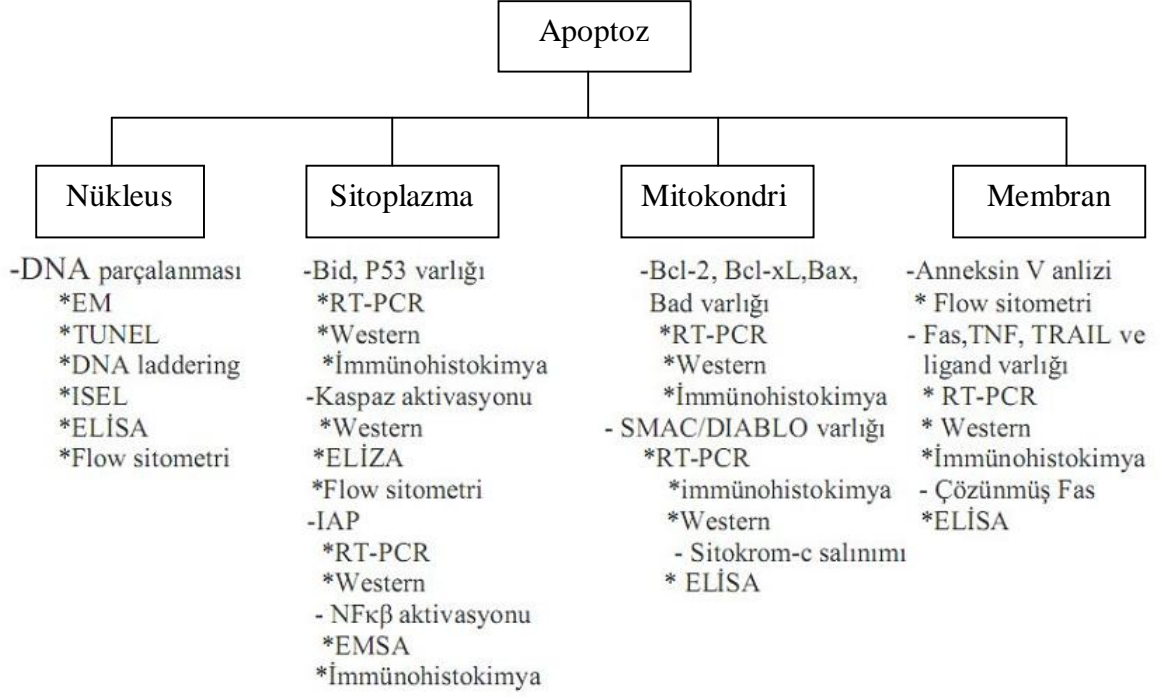
Ayrıca aktif kaspaz 3, ilgili proteinleri (hücre iskeleti proteinleri aktin veya fodrin, nükleer membran proteini lamin A, DNA tamirinde rol alan poli (ADP-riboz) polimerazı (PARP)) parçalayarak, apoptotik hücre morfolojisinin oluşmasını da sağlar.

Smac/diablo; kaspazlara bağlanarak kaspaz inhibisyonuna yol açan IAP'ın (inhibitors of apoptosis) yerini değiştirerek, Omi ise IAP'ı geri dönüşümsüz olarak inhibe ederek kaspaz aktivasyonunu sağlarlar.

AIF; direkt olarak nükleusa giderek kromatin yoğunlaşmasını başlatır ve endonükleaz G; kaspaz aktivasyonundan bağımsız olarak nükleustaki parçalanmaya katılır (57).

4.8. APOPTOZ BELİRLEME YÖNTEMLERİ

Apoptoza giden hücreleri saptama yöntemleri, bakılan kriterlere ve sensitiviteye bağlı olarak çeşitlilik göstermektedir. Aşağıdaki tabloda gösterilen yöntemlerin bazısındaki temel noktalar şunlardır.



Tablo 5: Her bir yöntemin, apoptoz sürecinde görev alan organellere göre dağılımı (58)

4.8.1. TUNEL

Apoptoz çalışmalarında kullanılan en yaygın test haline gelmiştir. Apoptotik sinyaller DNA üzerinde kırıklar oluşturur. TUNEL yöntemi, parçalanmış DNA'nın 3-OH ucuna deoksinükleotidil transferazın (TdT) spesifik olarak bağlanması prensibine dayanır. Açığa çıkan DNA kırıklarının serbest 3'-OH uçlarına terminal deoksiuridin trifosfatlar (TdT), terminal deoksinükleotidil transferaz (TdTaz) aracılığıyla eklenir. Eklenen uçların uzunlukları dUTP konsantrasyonlarının miktarına göre değişebilir.

DNA fragmanları digoksinin ile işaretlenir. İşaretlenmiş deoksinükleotidler anti-digoksinin-HRP (horseradish peroksidaz) konjugatı ile belirlenir. Konjugat diaminobenzidin ile reaksiyona girer ve çözünmeyen bir substrat oluşturur.

Uçları işaretlenmiş hücreler flow sitometri veya immünohistokimyasal yöntemlerle incelenebilir. Bu teknikle apoptoza uğrayan hücreler normal hücrelere oranlanarak apoptoz oranı belirlenebilir (apoptotik indeks=AI). TUNEL yöntemi, kültürde çoğaltılmış hücrelerde, donmuş kesitlerde ve parafin bloklarda apoptozun tespitinde kullanılabilir (59).

4.9. OKSİDATİF STRESS

Oksidatif stres, reaktif oksijen radikallerinin üretimi, antioksidan savunmadan daha fazla olduğu zaman gerçekleşir. Oksidatif stres belirteçleri; hidrojen peroksit, nitrik oksit ve isoprostane F2a-III gibi lipid peroksidasyon ürünleridir. Oksidatif stres, birçok biyolojik molekülü okside edip hücrelerde fonksiyon bozukluğu ve ölüme neden olarak, hücre dışı matriksi harap ederek, temel antioksidan savunmayı inaktive ederek, proteinazları aktive ederek veya TNF- α gibi transkripsiyon faktörlerini aktive edebilen ve histon asetilasyonunu kolaylaştırabilen gen ifadesini arttırabilir (19). Oksidatif stres sonucu lipid, protein ve DNA zararlanması oluşur (60).

Hücrelerin faaliyetleri boyunca çok farklı reaktif oksijen türevleri (ROT) üretilir ve bunlar savunma ya da redoks sinyal tepkimeleri gibi amaçlarla kullanılırlar. Bu ROT`ların bir kısmı antioksidan savunmayla sönmümlendirilirken bir kısmı da besin olarak kullanılır (61). Antioksidan savunma ağının amacı tüm ROT`ları sindirmek değil, onların oranlarını kontrol altında tutarak oksidatif hasarı da minimize etmektir (62).

Antioksidan olarak polifenoller hücre bileşenlerini oksidatif hasara karşı korurlar. Bu yüzden kanser ve Tip II diabet gibi çeşitli dejeneratif hastalıklar ile bağlantılı oksidatif stres riskini sınırlayabilirler. Düşük toksite ve çok az yan etki ile tedavi edici bir kimyasal ajan potansiyelindedir . EGCG`nin anti-oksidan etkisi hücreleri lipid peroksidasyonundan ve DNA`nın reaktif olan serbest radikallerce hasara uğramasından koruması şeklindedir (63).

5. MATERİYAL VE YÖNTEM

5.1. KULLANILAN KİMYASALLAR VE ÇÖZELTİLER

- 1) NaCl, Atabay AT091-950
- 2) Na₂HPO₄, Riedel-de Häen 81890
- 3) DMEM, Sigma D5546
- 4) Nutrient mixture F-12, Sigma N6658
- 5) L-Glutamin, Biological Industries 03-020-IC
- 6) Penisilin+Streptomisin, Biological Industries 03-031-1C
- 7) Fetal Sığır Serumu, Seromed S0115
- 8) Metanol, Riedel-DC-Haen 24229
- 9) Tripsin EDTA, Biological Industries 243338
- 10) DMSO, Sigma D 2650
- 11) Apoptag plus peroxidase kit (TUNEL) chemicon, S7101 millipore
- 12) Hematoksilen eosin
- 13) Epigallocatechin gallate, % 95, 50 mg, Sigma aldrich E4143

5.1.1. EGCG İçin Kimyasal Data

Sinonim: (2R, 3R)-2-(3,4,5-Trihydroxy-phenyl)-3,4-dihydro-1(2H)-benzopyran-3,5,7-triol 3-(3,4,5-trihydroxybenzoate),(-)-Epigallocatechin gallate,
(-)-Epigallocatechin gallate 3-O-gallate

Moleküler Formül: C₂₂H₁₈O₁₁

Moleküler Ağırlık: 458,4

Katalog no (CAS Registry Number): 989-51-5 (64).

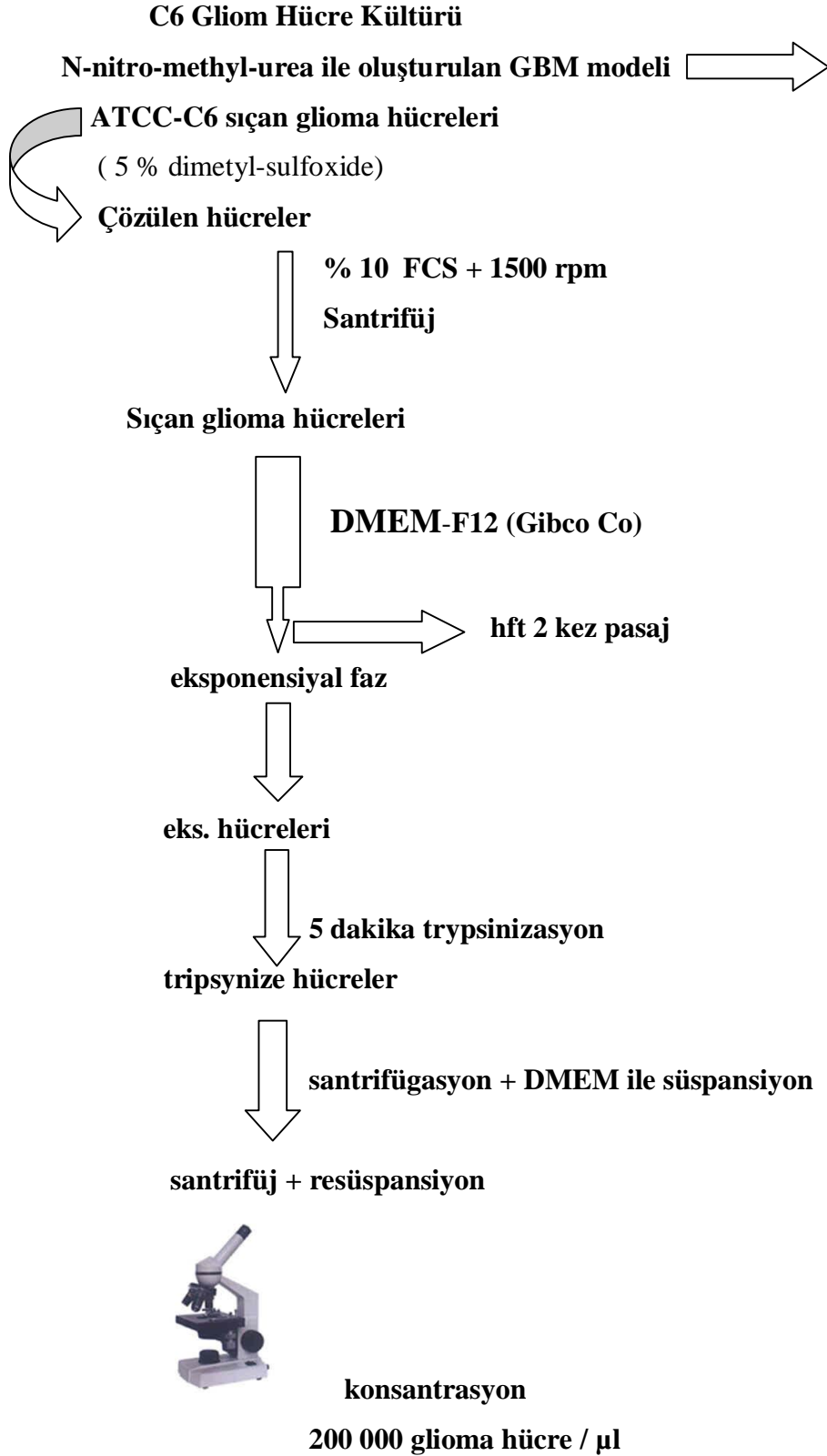
5.2. KULLANILAN YÖNTEMLER

5.2.1. Glioblastoma Multiforme Hücre Hattı (C6)

Deneilerimizde EGCG`nin zamana ve doza bağlı etkisini ölçmek için kullandığımız CCL-107 kodlu C6 hücre soyunu Amerikan Hayvan Hücre Kültür Koleksiyonu (American Type Culture Collection, ATCC, Rockville, Maryland, USA) hücre bankasından temin edilip, İstanbul Bilim Üniversitesi Hücre Kültürü Laboratuvarında pasajları yapılan hücre serisinden temin ettik. Sıçan kökenli olan C6 glioma hücreleri radyo dalgalarına duyarlıdır ve 200 cGY radyasyon dozunda ve 24 saatte bile açıkça etkilenirler.

5.2.2. Hücre Kültürü

Çalışmamız İstanbul Bilim Üniversitesi Hücre Kültürü Laboratuvarında gerçekleştirildi. C6 glioblastoma multiforme hücreleri, ısı ile inaktive edilmiş %5 fetal sığır serumu (FBS) ve antibiyotikler (100 unite/ml penisilin G, 100 µg/ml streptomisin) içeren Dulbecco's modified Eagle's medium (F12 medium) içinde 37 °C'de %5 CO₂ ve %95 hava içeren nemli inkübatörde büyütüldü.



Tablo 6 : C6 glioma hücre kültürü yöntemimiz

Hücreler, yuvarlak lamellere ekildikten sonra gece boyunca 37°C'lik %5 CO₂'li inkübatörde bekletildi. Deney gruplarımızın kültür ortamlarına 50 (B grubu) ve 100 (C grubu) µg/ml konsantrasyonunda EGCG eklendi ve 24, 48 ve 72 saat inkübasyona devam edildi. Deneylerimizin sonuçlarını incelemek için yaptığımız karşılaştırmalı gruplandırmalar şu şekildedir :

Hücre grubu	Grup A 0 µg/ml	Grup B 50 µg/ml	Grup C 100 µg/ml
24 saat	A1	B1	C1
48 saat	A2	B2	C2
72 saat	A3	B3	C3

Tablo 7 : Rakamsal gruplar süre (1, 2, 3), harfler doz (A, B, C) gruplarını belirtmektedir.

5.3. APOPTOZUN GÖSTERİLMESİ

5.3.1. TUNEL Yöntemi

Apoptotik hücre ölümünün yol açtığı DNA fragmantasyonu in situ TUNEL yöntemi ile ölçüldü.

TUNEL boyama protokolümüz:

1. 25 cm² lik flasklarda kültüre edilen C6 glioma hücreleri pasajlanarak yuvarlak lamellerin üzerine ekildi.
2. 24 saat %5 CO² inkübatörde kültüre edildi.
3. Kültüre edilen hücreler 24 kuyucuklu platelere aktarıldı. 50µg ve 100 µg/ml olacak şekilde EGCG kuyucuklara eklendi.
4. Hücreler %5 CO² inkübatörde 24saat, 48 saat ve 72 saat olacak şekilde inkübasyona bırakıldı.
5. İnkübasyon sonrası hücreler 1xPBS ile 5 dakika yıkandı.
6. – 20 °C de metanol ile hücreler 5 dakika fikse edildi.
7. Metanol sonrası hücreler 1xPBS`te 5 dakika bekletildi.
8. Fiksasyon sonrası hücreler 5 dakika Equilibration Buffer ile muamele edildi.
9. Bu aşamada her lamel için 57 µl TdT tamponu 3 µl TdT enzimi ile karıştırıldı.
10. İnkübasyon süresi sonunda coversleplerden Equilibration Buffer uzaklaştırıldı ve Tdt karışımı eklendi.
11. Hücreler 37 °C`de 1 saat Tdt ile inkübasyona bırakıldı.
12. İnkübasyon sonrası PBS ile 3x1 yıkama yapıldı.
13. Yıkama sonrası hücreler üzerine anti-digoksinin konjugatı eklenerek oda ısısında 30 dakika inkübasyona bırakıldı.
14. 2x4 1xPBS ile yıkama sonrasında hücreler 1x3 distile su ile yıkandı.
15. Hücrelere DAB peroksidaz substratı eklendi ve reaksiyonun oluşması mikroskopta takip edildi.
16. Reaksiyon 1x3 distile su ile durduruldu.
17. Zıt boyama için hücreler 5 dakika Hemotoksilen Eozin ile muamele edildi.

18. Hücreler zıt boyama sonrasında musluk suyundan birkaç kez geçirildi.
20. Lameller üzerindeki hücreler temiz lamlara kapatma medyumunu ile kapatıldı.
21. Hücreler mikroskopta incelendi.

5.3.2. Apoptozun Ölçülmesi

Apoptotik hücreler morfolojik tanıma kriterlerine göre yapılan alan sayımlarıyla belirlendiler. Hücrelerin fotoğrafı Olympus BX-50 ışık mikroskobu ile ve X60`lık büyütmede çekildi. Her preparatta X60`lık mikroskop büyütmesi altında saat yönünde ilerleyerek rastgele 50 alan belirlendi ve her görme alanında tespit edilen tünel spesifik boyanmış apoptotik hücreler toplam hücre sayılarına oranlanarak preparat başına 50 apoptotik indeks değeri elde edildi. Kahverengi ile işaretli hücreleri apoptotik hücre olarak nitelendirdik.

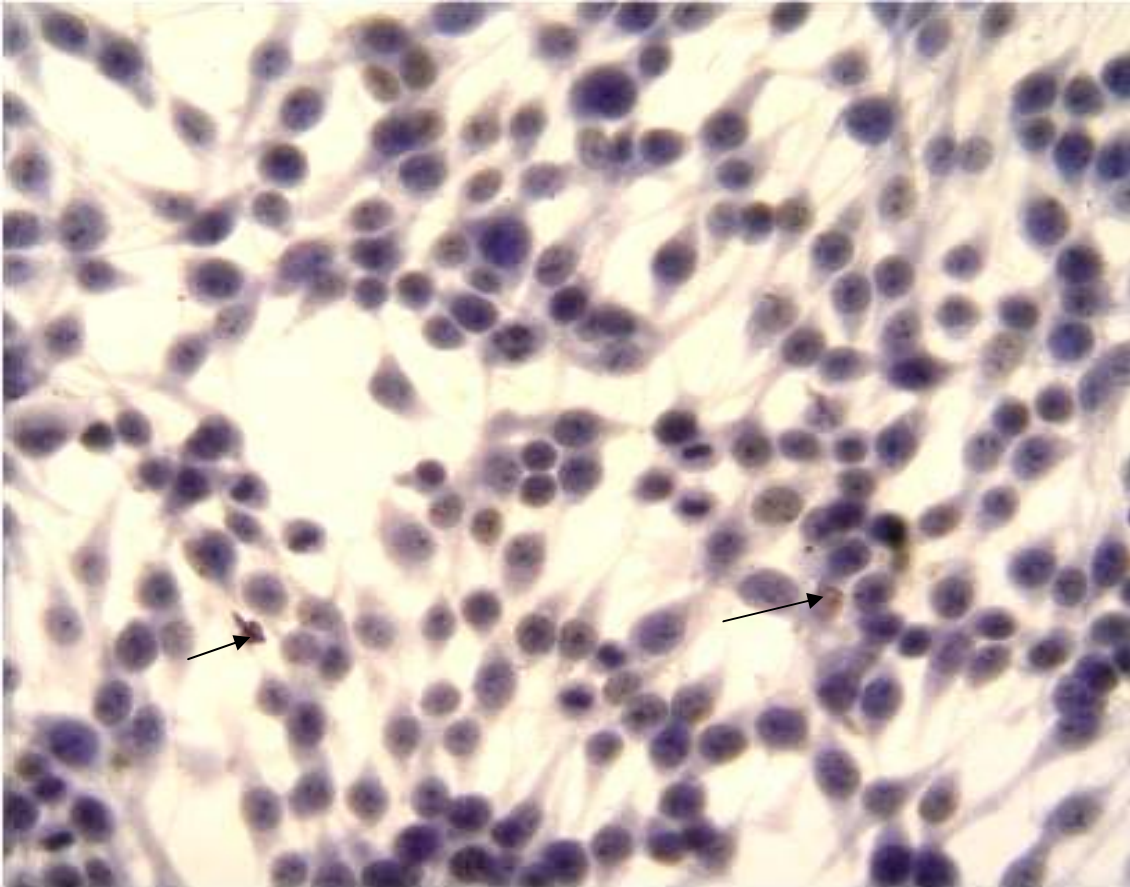
5.4. İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME

Apoptoza ait verilerin karşılaştırılması ve değerlendirilmesi aşamasında ANOVA (analysis of variance) tip test kullanıldı. ANOVA testinin kullanım amacı birden fazla veriyi birlikte ele alarak ve aralarındaki korelasyonu daha net görebilmeye olanak tanınmasıdır. İstatistiksel anlamlılık sınırı $p < 0,001$ olarak alındı

6-BULGULAR

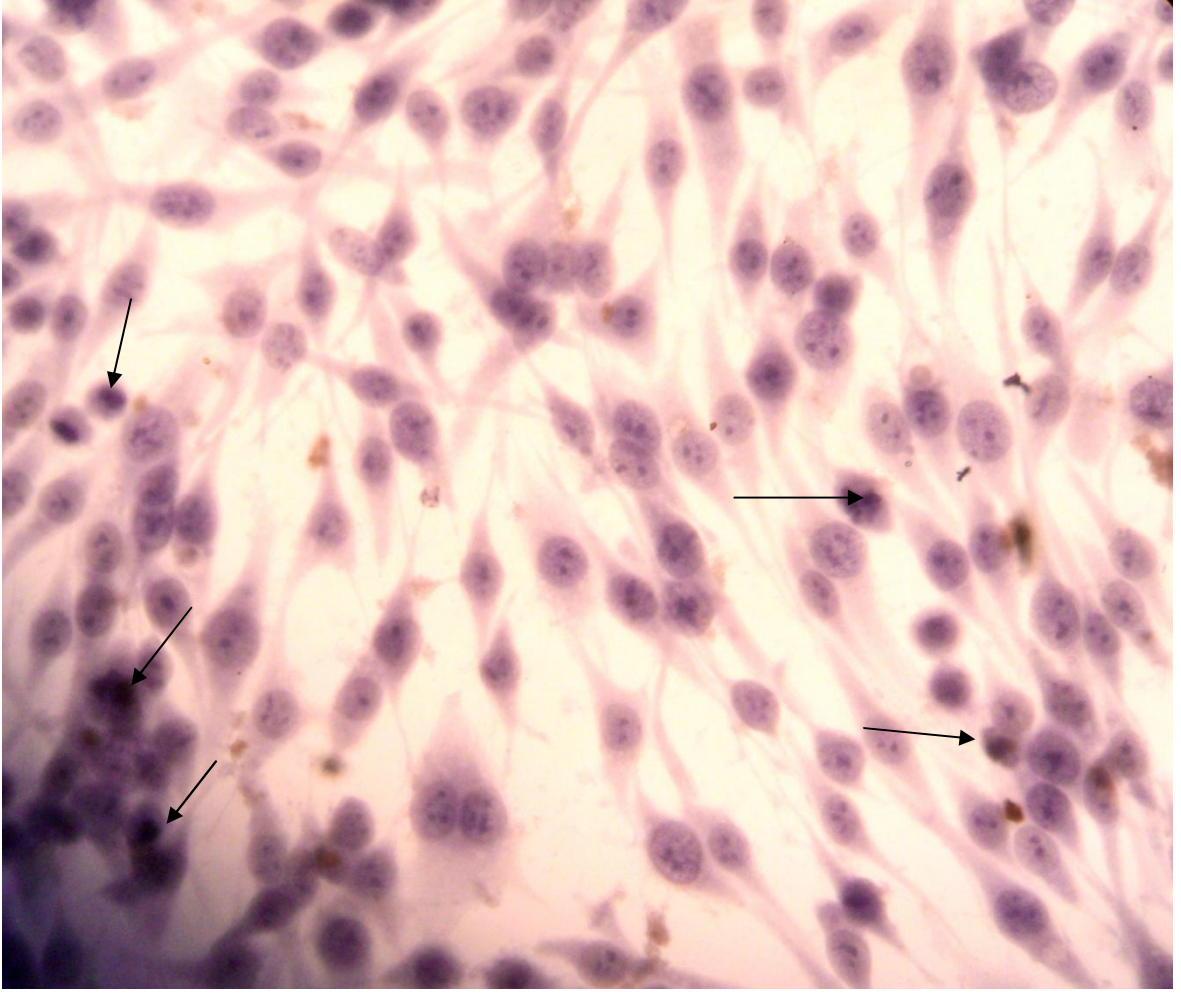
6.1. VERİLERİN MİKROSKOBİK ANALİZİ

Tekrarlı deneylerimizde gözlemlediğimiz artmış dozun uzun sürelerde hücreleri programlı hücre ölümüne, düşük doz ve kısa süreli örneklere göre daha çok indüklediği şeklindedir. Kontrol gruplarımızda çok az rastlanılan apoptoz uzun süreler söz konusu olunca anlamsız da olsa bir miktar artmıştır.



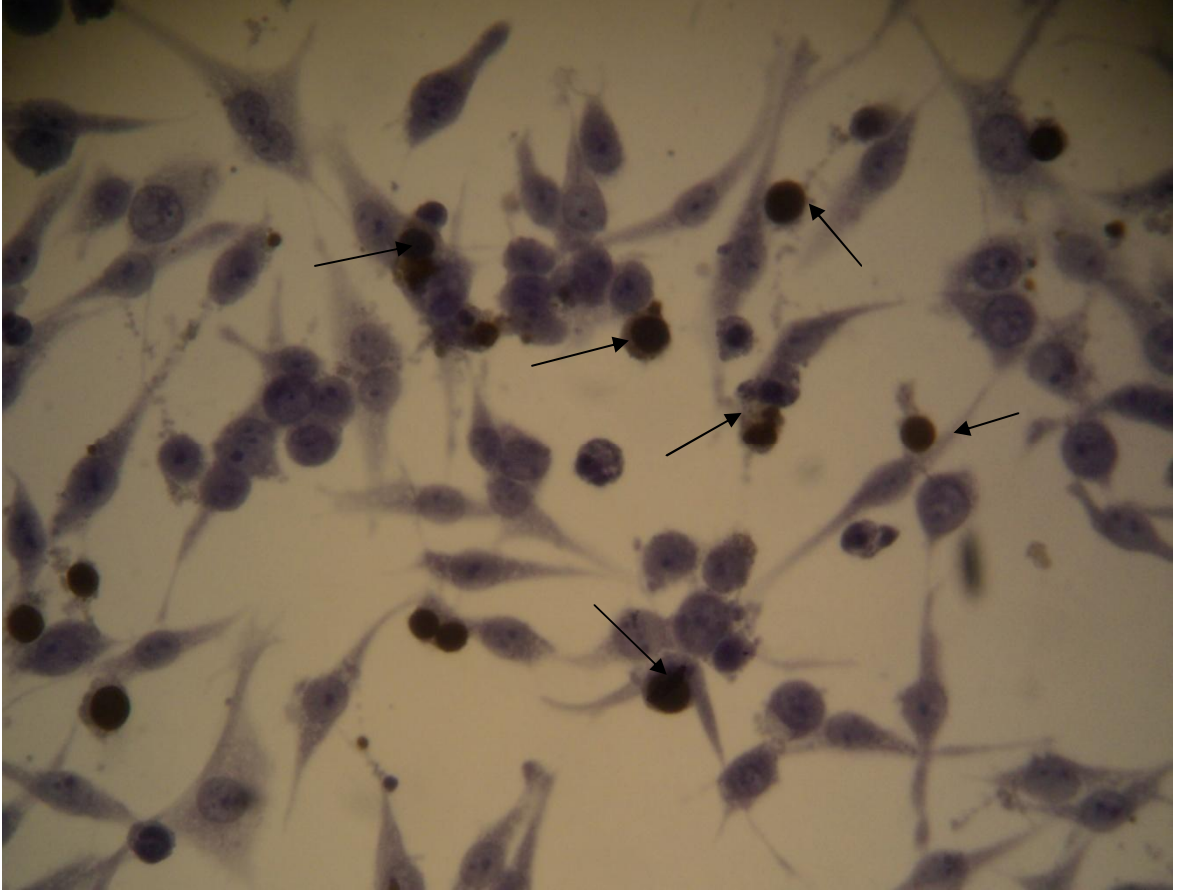
Resim 4: 24 saatlik kontrol grubunun (A1) görüntüsü, X600

C6 glioma hücre hattında EGCG ile etkileşime sokulmadan 24 saat kültüre edilmiş hücre A1 hücre hattında beklendiği gibi neredeyse hiç morfolojik değişiklik görülmedi (Resim 4)



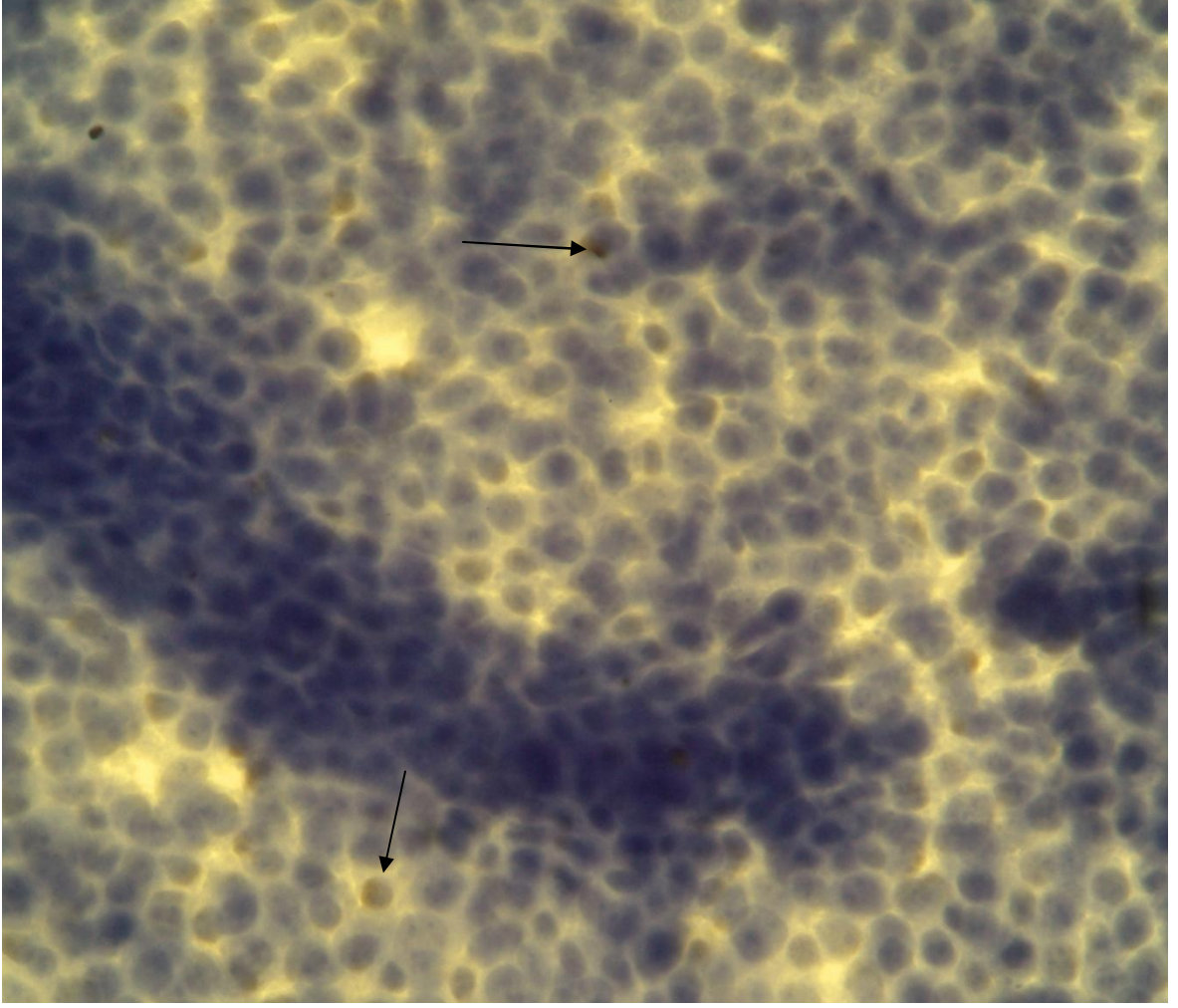
Resim 5: 24 saatlik 50 µg/ml EGCG ile muamele edilen (B1 grubu) hücrelerin görüntüsü X600

24 saat µg /ml EGCG ile etkileşime sokulmuş C6 glioma hücrelerinde apoptozun az miktarda gerçekleşmesi bize düşük doz ve kısa sürenin apoptozla ilgisine dair bir ipucu vermedi (Resim 5).



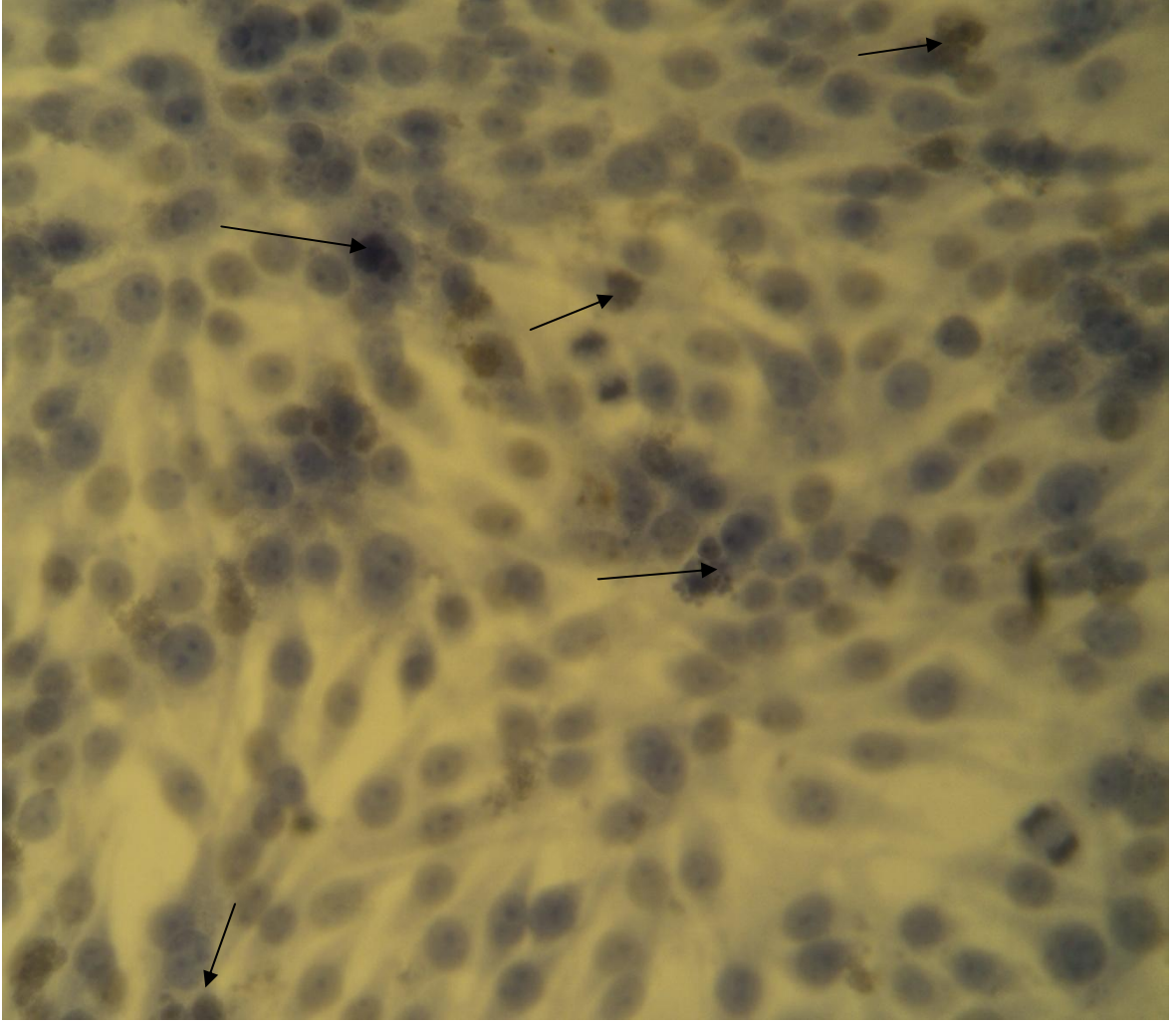
Resim 6: 24 saat boyunca 100 µg/ml EGCG ile muamele edilen (C1 grubu) hücrelerin görüntüsü, X600

Resim 6`daki görüntüde 100 µg /ml EGCG ile muamele edilmiş hücrelerin (C1 grubu) 24 saat sonundaki durumu görülmektedir ve Resim 5`teki aynı süre ve düşük dozla kıyaslanınca bu dozdaki apoptoz miktarı anlamlı bir şekilde fazlaydı.



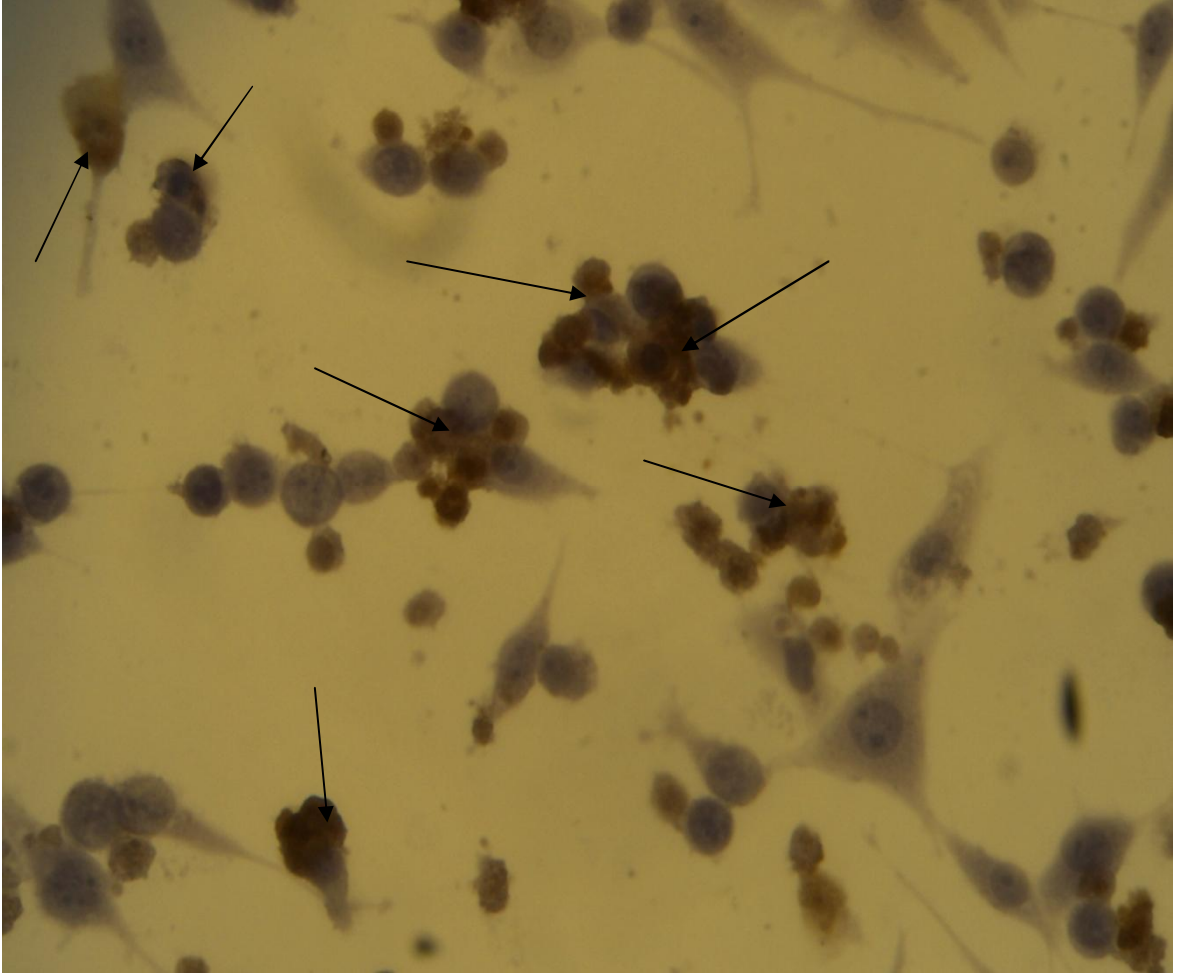
Resim 7: 48 saatlik (A2 grubu) kontrol grubunun görüntüsü, X600

Kontrol grubunda (A2) normal görüntüsünde hiç değişiklik olmayan hücreler 48 saat sonunda yukarıdaki şekilde izlendiği gibi anlamlı bir farklılık göstermiyordu (Resim 7).



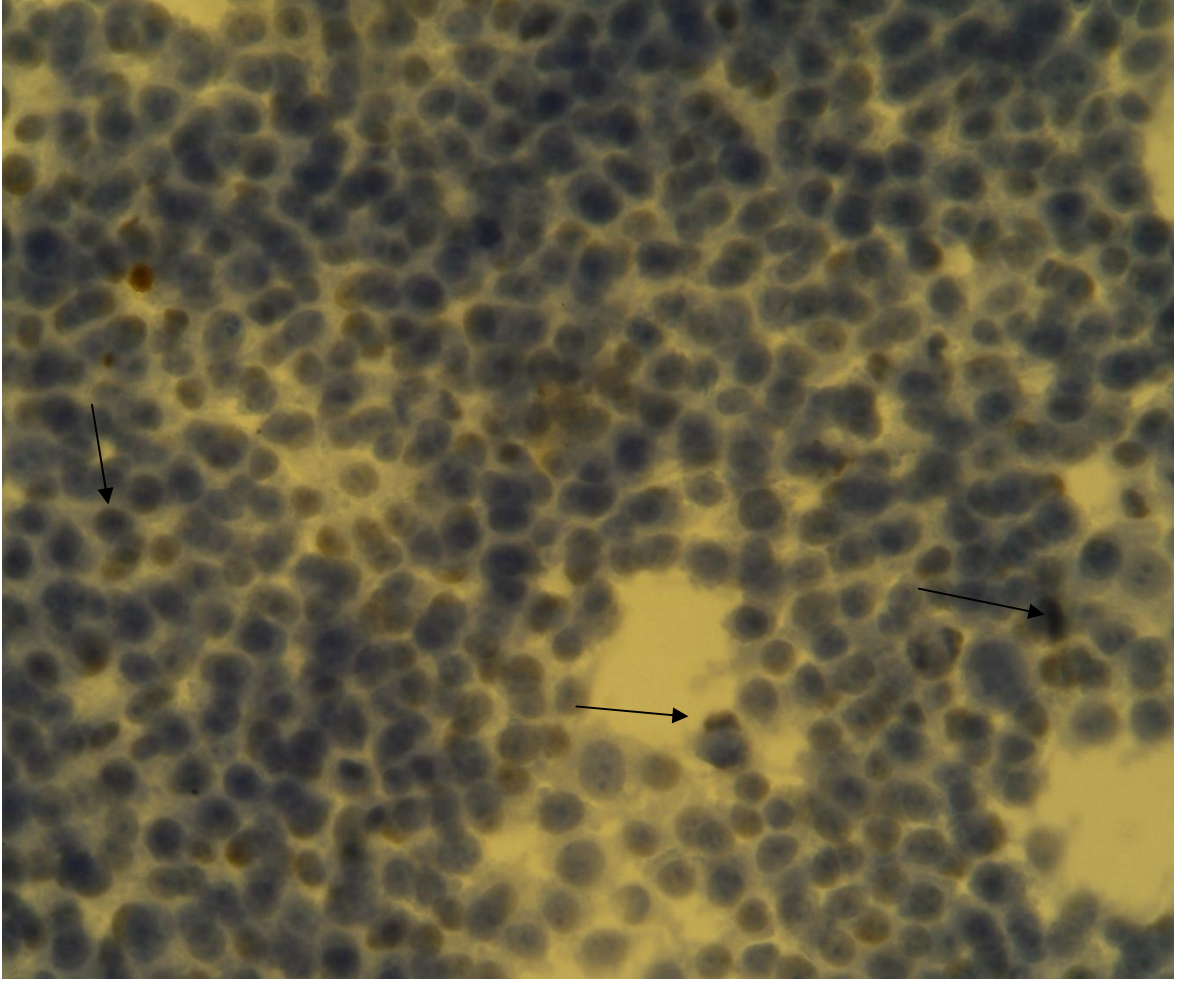
Resim 8: 48 saatlik, 50 µg/ml EGCG ile muamele edilen C6 glioma hücrelerinin (B2 grubu) görüntüsü, X600

Resim 8`de görüldüğü gibi daha düşük süre ve aynı dozdaki apoptotik indeksin karşılaştırması bize (24 saat, 50 µg /ml ile 48 saat, 50 µg /ml) farkın çok anlamlı olmadığını gösterdi.



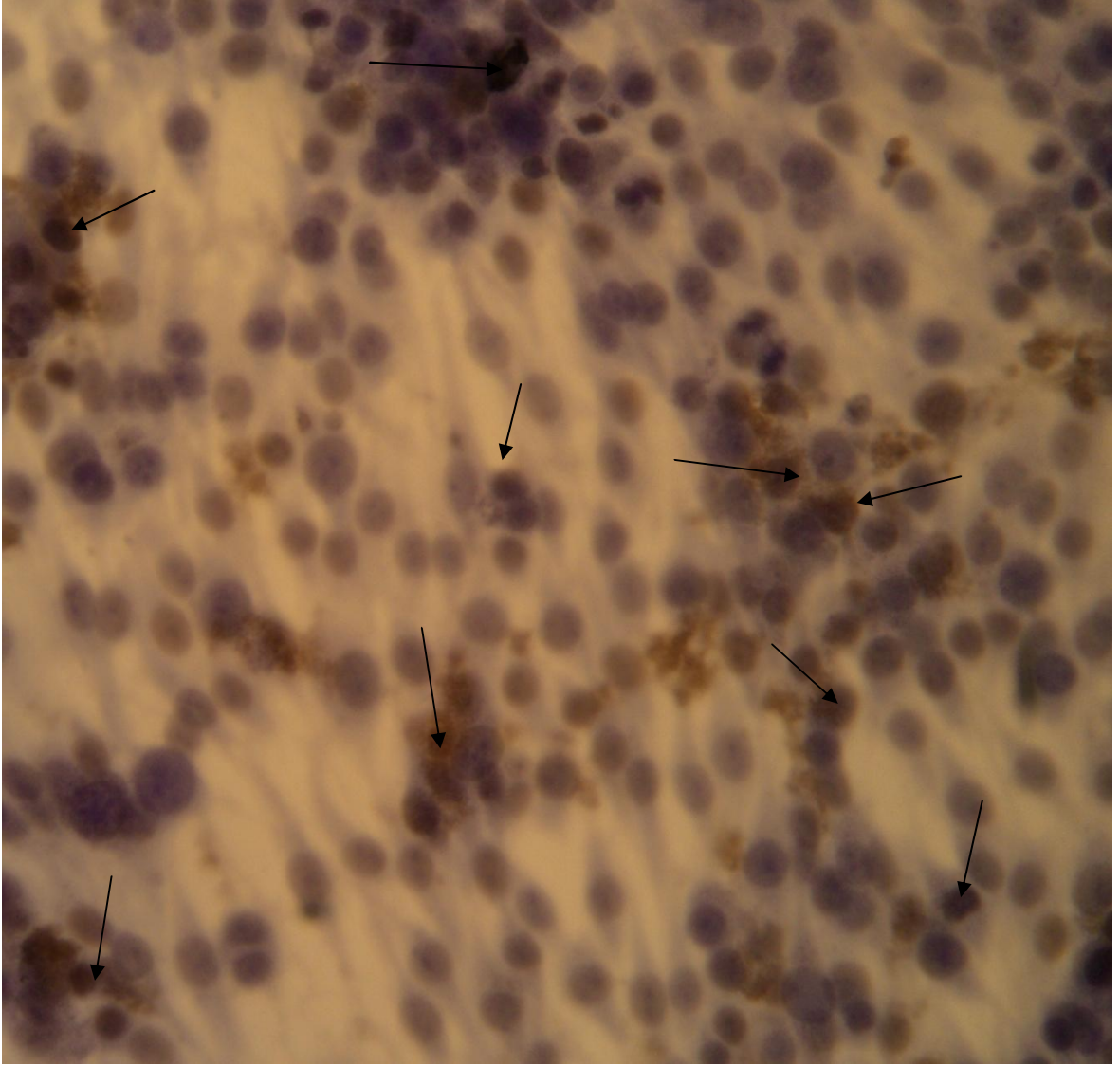
Resim 9: 48 saatlik, 100µg/ml EGCG ile muamele edilen C6 glioma hücrelerinin (C2 grubu) görüntüsü, X600

100 µg /ml EGCG uygulanmış grupların 24 saatlik ve 48 saatlik olanları karşılaştırıldığında 100 µg /ml (C2 grubu) lehine apoptozda anlamlı bir artışın olduğunu saptadık (Resim 9).



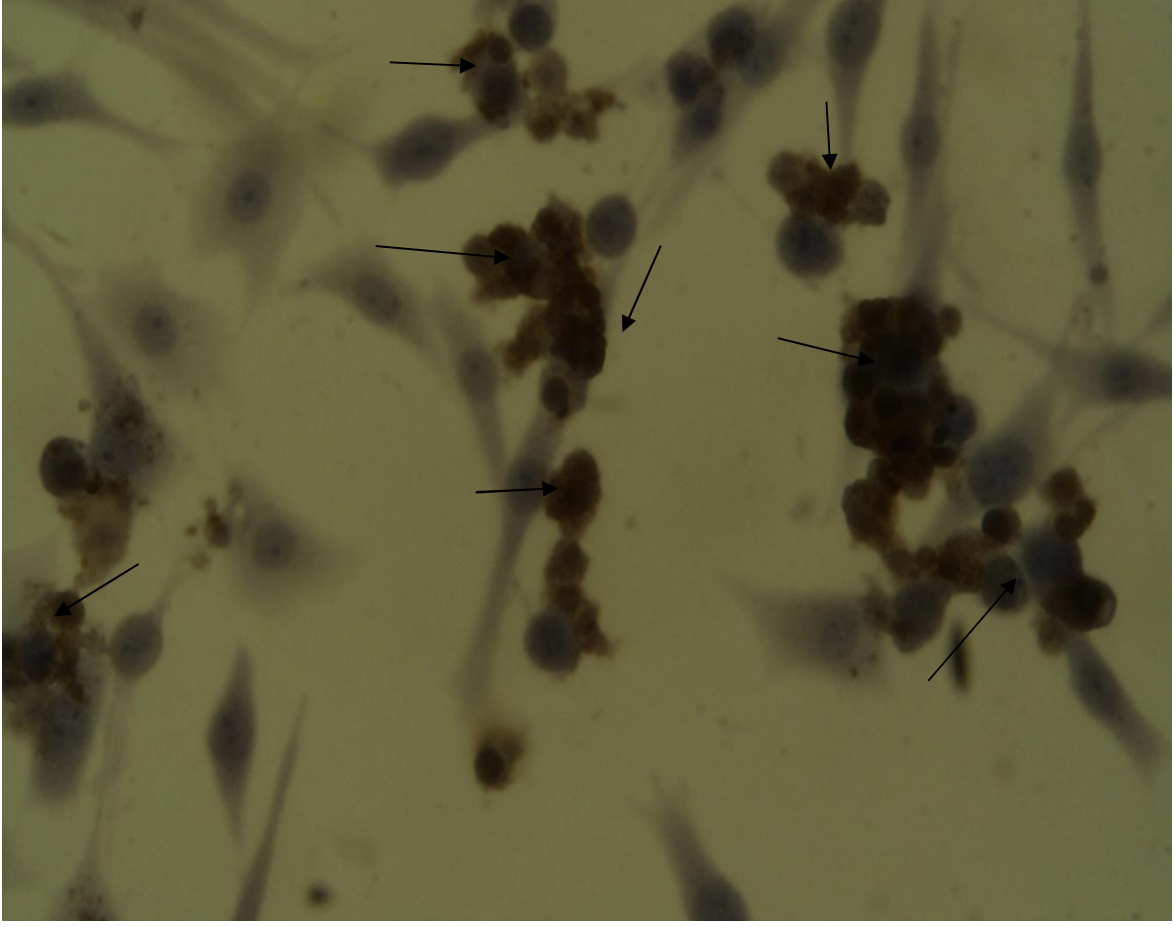
Resim 10: 72 saatlik kontrol grubunun (A3 grubu) görüntüsü, X600

72 saat sonucunda önceki saat sürelerine göre apoptotik hücre sayısının istatistiksel olarak anlamsız şekilde bir miktar arttığını bulduk (Resim 10).



Resim 11: 72 saatlik, 50 µg /ml EGCG ile muamele edilen C6 glioma hücrelerinin (B3 grubu) görüntüsü, X600

50 µg /ml EGCG uygulamasının 72. saatindeki apoptotik hücre sayısı 24 ve 48. saatlere oranla anlamlı bir şekilde yüksektir (Resim 11).



Resim 12 : 72 saatlik, 100 µg /ml EGCG ile muamele edilen C6 glioma hücrelerinin (C3 grubu) görüntüsü, X600

Yüksek doz ve uzun süre sonunda gözlenen apoptoz, süre ve dozun interaksyonu hakkında fikirler verebilir. 100 µg /ml EGCG`nin 72 saatlik uygulaması sonucunda C6 hücrelerinde apoptoza yönelme en fazla miktarda gerçekleşmiştir (Resim 12).

6.2. VERİLERİN KIYASLANMASI VE APOPTOTİK SONUÇLAR

Bu çalışmada 50 ve 100 µg/ml dozlarda EGCG'nin 24, 48 ve 72. saatler sonundaki apoptotik indüksiyonu gözlemek üzere her zaman dilimine ait kontrol gruplarıyla karşılaştırılan preparatların farklı bölgelerinden elde edilen apoptotik hücre sayımlarına göre elde edilen apoptotik indeksler ANOVA testinde değerlendirildi ve doz, zaman ve doz-zaman etkileşimine ait veriler rakamsal olarak yorumlandı.

Değerler ortalama standart hata olarak ifade edildi ve grupların birbirleriyle karşılaştırma sonuçları istatistiksel olarak anlamlı bulundu.

Tablo 8 : Tüm dozlara bağlı ilişki

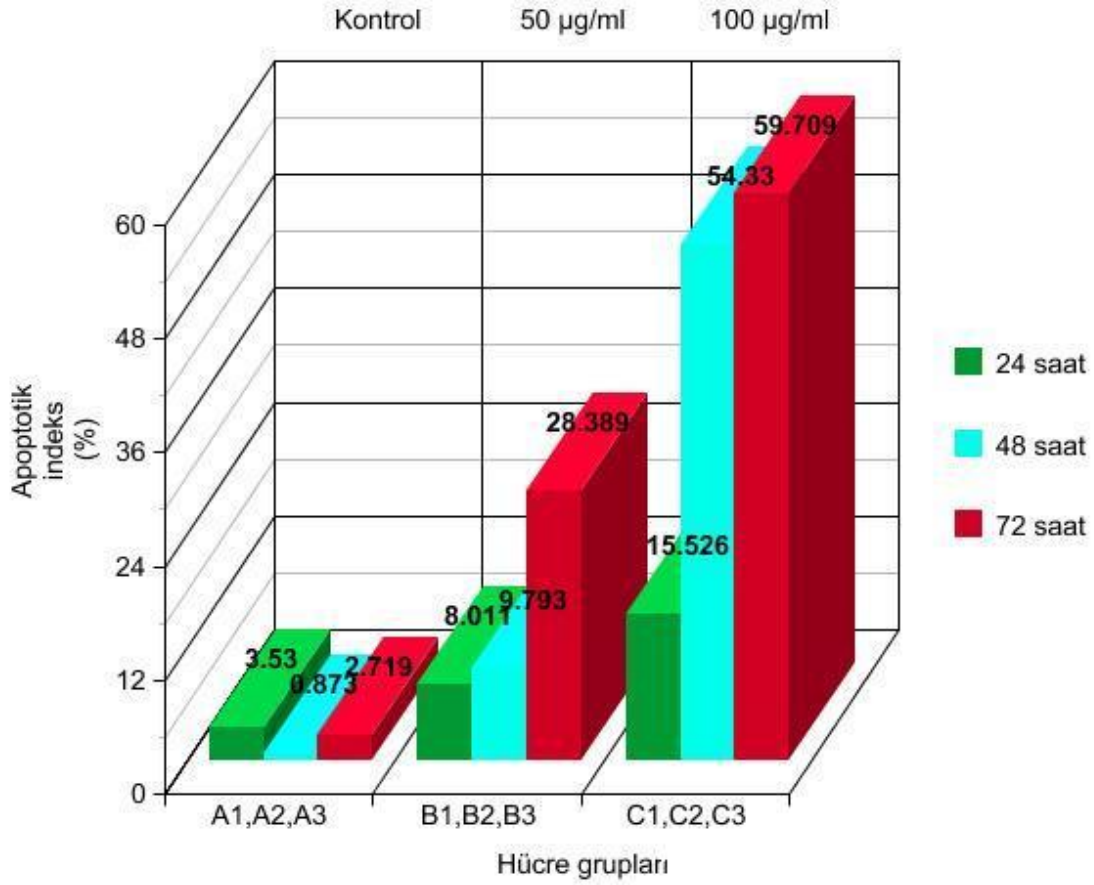
Grup	Doz µg/ml	Ortalama+ standart hata
A (1, 2, 3)	0	2,38 ± 1,03
B (1, 2, 3)	50	15,40 ± 0,76
C (1, 2, 3)	100	43,19 ± 0,76

Tablo 9 : Doz ve zaman etkileşimine göre elde edilen verilerin karşılaştırılması

Doz ve Zaman	Standart hata	24 saat	48 saat	72 saat
Kontrol	± 1,783	3,538	0,873	2,719
50 µg/ml	± 1,310	8,011	9,793	28,389
100 µg/ml	± 1,310	15,526	54,330	59,709

6.2.1. Doz Etkinliği

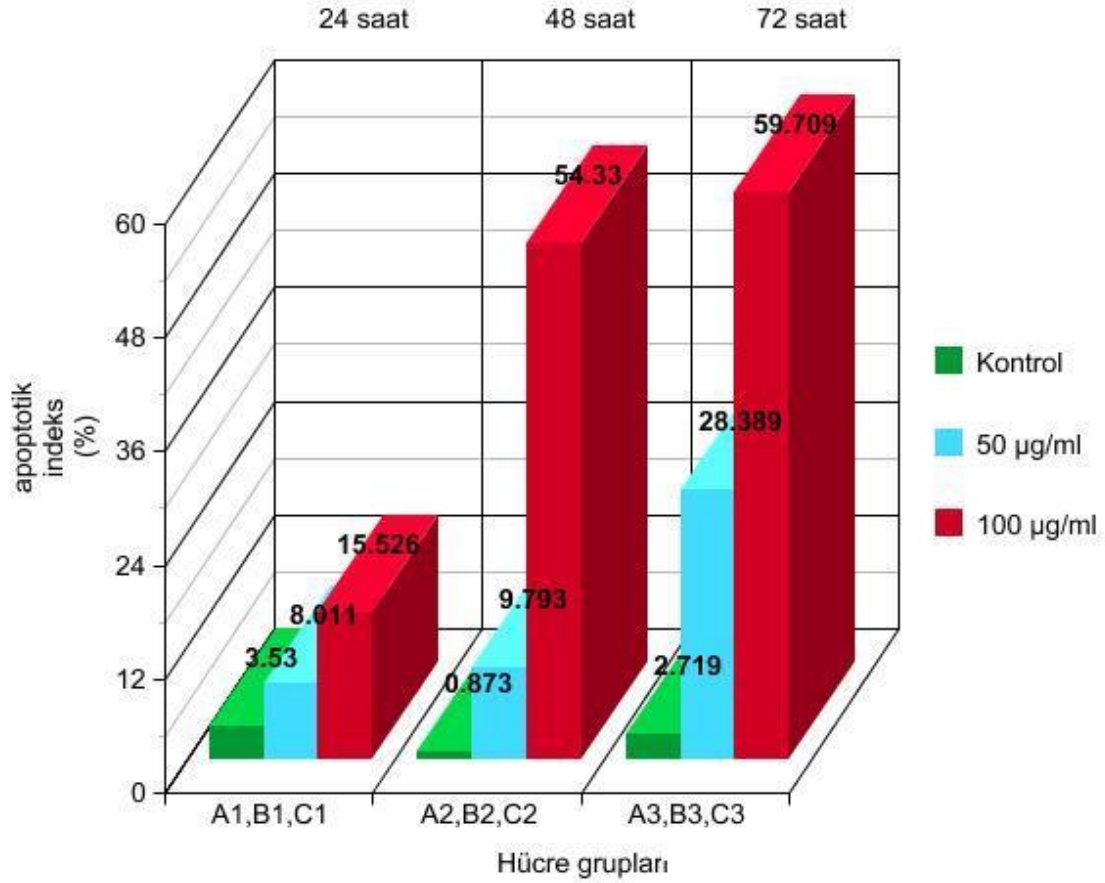
Doz; apoptotoza giden hücrelerin sayısı üzerine etkilidir. EGCG dozu arttıkça hücrelerin daha çok apoptotoza gittiği ve buna bağlı olarak da apoptotik indeks miktarının arttığı görüldü (Tablo 12).



Grafik 1: 0, 50 ve 100 µg /ml EGCG dozlarına ait apoptotic etki grafiği (p<0,001 ve A, B, C gruplarının ortalamaları arasındaki farklar anlamlıdır)

6.2.2. Zamanın Etkisi

Zaman arttıkça uygulanan EGCG'nin apoptotik etkisinin zamana bağlı olarak arttığı gözlemlendi (Tablo 13).

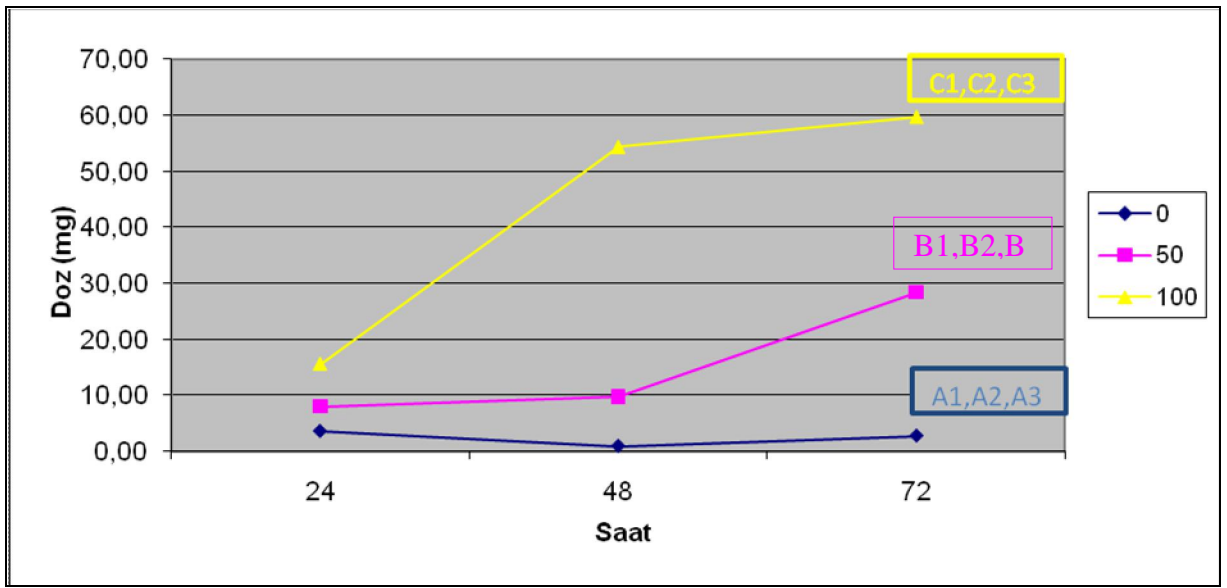


Grafik 2: EGCG'nin zaman etkisi

($P < 0,001$ ve A, B, C gruplarının ortalamaları arasındaki farklar anlamlıdır.)

6.2.3. Doz ve Zaman İnteraksiyonu

EGCG'nin farklı dozlarının farklı zaman aralıklarında apoptotik etkisi önemli bulunmuştur. 50 ve 100 µg/ml gruplarında zamana bağlı olarak apoptozun arttığı gözlemlenirken kontrol gruplarında zamana bağlı olarak anlamlı bir apoptoz değişimi gözlemlenmedi. En çok apoptotik etki 100 µg/ml dozda ve 72. saatte tespit edilmiştir (Tablo 14).



Grafik 3: EGCG'nin doz-zaman interaksiyonu

($p < 0,001$ ve A, B, C farklı harfleri taşıyan ortalamalar arasındaki fark önemlidir)

Grafik 14'te görüldüğü gibi C6 glioma hücreleri EGCG ile düşük doza maruz bırakıldığında kısa sürede anlamlı bir apoptotik artış görülmedi ancak EGCG etkisini uzun sürede yani 72. saatte göstermekteydi. Buna karşılık yüksek dozda (100 µg /ml) apoptotik etki daha erken dönemdeyken bile anlamlı bir şekilde yüksek bulundu.

7. TARTIŞMA

Kanserle mücadele yollarından biriside kanserli hücrelerin apoptoza yönlendirilmesidir. Genel olarak bakıldığında EGCG kendi başına bir apoptoz indükleyici ajandır. Polifenollerin önemli bir özelliği de apoptoz oluşumunun farklı aşamalarında ve/veya düzenleme proteinlerinin ekspresyonuna (sitokrom c ve takiben kaspaz-9 ve kaspaz-3 ün aktivasyonunda) (65,66,67), kaspaz-8 ve t-Bid miktarı artışına (66), Bcl-2 ve Bcl-XL ekspresyonlarının regülasyonunun azaltılması, Bax ve Bak artırılmış ekspresyonuna (66,68,69) ve NF-KappaB transkripsiyon faktörlerinin düzenlenmesine (70), doğrudan etki edebilmesidir. Ayrıca çay flavanollerini mitojenle aktive olan protein kinazları (MAPK), sikline bağımlı kinazları, aktivatör 1 proteinlerinin aktivasyonu (AP-1) ve büyüme faktörü sinyallerini inhibe eder (71,72). EGCG`nin kanserli hücrelerin hücre siklusunu duraklattığını ve apoptoza yönlendirdiğini, ama bunu yaparken normal hücrelere etki etmediği yada etkisinin az olduğu gözlemlenmiştir (73). Buna göre EGCG bir çok tümör hücrelerini apoptoza yönlendirebilir. Bu seçimli apoptotik potansiyeliyle EGCG üzerinde durulması gereken bir anti-neoplastik ajandır.

Kateşinlerin kanserdeki önemleri onların sebep oldukları biyo aktivitelerden gelmektedir. Kateşinler, hidroksil radikalini (OH), süperoksit anyon radikalini (O₂), peroksil ve alkoksil radikallerini temizler, lipid peroksidasyonunu önler (74,75,76). Kateşinler fare epidermis DNA `sında 5-hidroksimetil-2`-deoksiürüdin ve 8-hidroksil-2`-deoksiguanozin düzeyini azaltır (77). Fujiki H. ve arkadaşları toksik olmayan kimyasal kanser önleyici ajanlar geliştirmek amacıyla fare derisi üzerinde tümör gelişimi prosesini inhibe eden ajanlarla yapmış oldukları çalışmanın sonucunda Japon yeşil çayının ana bileşeni olan EGCG`nin günlük hayatta kullanılabilir pratik kanser önleyici etkisinin olduğuna inanmışlardır (74). 1992 yılında yeşil çay kanser önleyici ajan olarak onaylanmıştır (78).

Kateşinler için öne sürülen çok sayıda mekanizma bulunmakta olup bunlar tüm kanserler için genellenemez. İnsanda kanser hücreleri yayılmak ve metastaz oluşturmak için proteolitik enzimlere ihtiyaç duyarlar. Bu enzimlerden biri ürokinaz (ÜK) olup ÜK inhibisyonu tümör boyutunu azaltabilir veya farelerde kanserin tam remisyonuna sebep olabilir.

Bilinen ÜK inhibitörleri kanser tedavisinde kullanılmazlar. Çünkü bunların inhibitör aktiviteleri zayıf veya oldukça toksik etkilidir. Polifenollerin ÜK üzerinde iyi bir baskılayıcı potansiyele sahip olduğu gösterilmiştir. Yeşil çayın iyi bilinen anti-kanser etkisinin ÜK`yı inhibe etme şeklinde olduğu önerilmiştir (78).

EGCG, tümör promotörü olan okadaik asit etkisi ile indüklenen BALB/3T3 hücrelerinde TNF- α (Tümör nekrozis faktör) salınımını inhibe eder. Bundan yola çıkarak EGCG`nin m-RNA ekspresyonunu, salınımını ve tümör promotörün hücrelerle etkileşimini engelleyerek inhibe ettiği ileri sürülmektedir (79).

Telomeraz bölünmeleri sırasında kanser hücrelerinin kromozomlarının uçlarını korur ve onların proliferasyon kapasitesi için esansiyeldir. EGCG, hücre ekstraktında ve canlı hücrelerde telomerazı inhibe ettiği gösterilmiştir. Çayın antikanser özelliğinin açıklanmasında, ana mekanizmalardan biri telomerazın inhibisyonu olabilir (80).

EGCG`nin kansere karşı koruyuculuk sağlayan anahtar aktif bileşenler olduğuna inanılıyor. Bunlar tümör promotörlerinin indüklediği aktivatör protein 1`i (AP-1) ve neoplastik dönüşümü inhibe eder (81). Kateşin, A431 hücrelerinde hücre siklusunu G0-G1 evresinde durdurmakta ve apoptoza neden olmaktadır (82). İnsan meme epiteli 184-B5 hücrelerinde benzopirenin (BP) indüklediği hatalı proliferasyonu EGCG inhibe eder. Kateşin bunu p53 bağımlı apoptozu indükleyerek ve hücre siklusunu düzenleyerek yapmaktadır (83).

Yeşil çay kateşinleri, insan mide kanseri KA-TO III hücrelerinin, insan lösemi MOLT-4B hücrelerinin, DU 145 insan prostat hücrelerinin apoptozunu indüklediği ve hücre büyümelerini inhibe ettiği saptanmıştır (84). Hirose ve arkadaşlarının yaptığı çalışmalarda yeşil çay kateşinlerinin ince barsakta kanser oluşumunu karsinojenle birlikte veya kanser oluşuktan sonra verilse dahi baskıladıklarını göstermişlerdir (85).

Anti-inflamatuar aktiviteyi inhibe eder. Bu etki kateşin ve onun türevlerini, kanser oluşumunun başlama, ilerleme ve yayılma safhalarına karşı daha etkili yapar (86).

Birçok tümör hücre serisinde EGCG tümörün büyümesini inhibe eder. EGCG`nin normal W138 hücreleri ve kanser hücreleri olan W138VA ile normal insan fibroblastları üzerine etkisi incelenmiştir. 40 μ M konsantrasyonlarda EGCG normal hücreler üzerine etki göstermezken; kanser hücrelerinin büyümesini inhibe eder. Aynı hücreler 200 μ M dozda EGCG`ye 8 saat maruz bırakıldıklarında, kanser hücrelerinin %50`den fazlası apoptoza yönelirken, normal hücrelerin sadece %1`den azı apoptoza gitmiştir (87).

Literatürde sözünü ettiğimiz tümör hücreleriyle ilgili çalışmalar bulunduğu halde bizim çalışmamızda kullandığımız C6 glioma hücreleriyle yapılmış çalışmamıza benzer bir çalışmaya rastlanmadı. Sonuçlarımızı sadece doz artışı açısından incelediğimizde doz arttıkça apoptozun anlamlı bir şekilde arttığını bulduk. Bulgularımızı hem dozun artırılmasına, hem süreye bağımlı olarak irdelediğimizde bulduğumuz doz artışına paralel zamanın belli bir apoptotik değere kadar apoptozu indüklediği ama belli bir apoptotik orandan sonra zamanın çok az bir değişikliğe katkıda bulunduğunu gördük. Çalışmamıza en yakın olan araştırmada Ahmad ve ark. (1998) EGCG'nin sadece malignant tümör hücre hatlarını apoptoza indüklediğini ve normal hücrelere etkisi olmadığını göstermiştir (82). Ayrıca sonuçlarımızı destekler başka bir çalışmada Shunichi ve arkadaşları (2001) EGCG'nin malignant tümörleri inhibe ettiğini söyledikleri bulgularıyla deneylerimize paralel sonuçlar elde etmişlerdir (88).

EGCG'nin in vitroda bir beyin tümörü olan C6 gliomaları etkilemesi önemliydi. Konu beyin olunca karşımıza ciddi bir soru çıkar: Kateşin grubu maddeler acaba kan-beyin bariyerini geçebilmekte midirler? Geçemedikleri takdirde bu invitro etkinin uygulamada bir önemi bulunmaz. Lei -Chwen ve ark. oral yolla fare ve ratlara verdikleri EGCG'nin plazmadaki oranından başlayarak beyindeki absorpsiyonunu araştırmışlardır. LC-MS yöntemleriyle gösterdikleri kateşinlerin kan-beyin bariyerini geçtiğini göstermişlerdir (89). Bu durumda in vitroda elde ettiğimiz etkilerin in vivo da geçerli olabileceği kanısındayız.

Bizim bu sonuçlardan başka çalışmanın giderek artan dozlarda ve benzeri apoptotik etkileri olduğu düşünülen diğer antioksidanlarla da kombine edilerek tekrarlanmasının sonuçları çok daha kuvvetli hale getireceğine inanıyoruz. Ayrıca bizim bulgularımızın paralelinde C6 glioma hücrelerinin steriotaksik yöntemlerle sıçanların beynine yerleştirildikten sonra hayvanlara kateşinleri uygulamamız EGCG'nin in vivo sonuçlarını da görmemizi sağlayacağı kanısındayız.

8. SONUÇ

Ulaşılan literatürde EGCG`nin savunduğumuz şekilde bir apoptoz indükleyici ajan olduğu ve bu etkinin farklı hücre tipleri üzerinde değişik oranlarda etkin olduğu kaydedilmiştir. Deneylerimizde EGCG`nin etkisini C6 glioma hücreleriyle oluşturduğumuz modelde inceledik. Apoptotik hücreleri TUNEL metoduyla işaretleyip görünür kıldıktan sonra yaptığımız mikroskopik gözlem ve analitik testlerden sonra şu çıkarımlarda bulunduk:

EGCG nin apoptoz üzerinde etkin bir ajan olduğu ve bu etkinin doz, süre ve hem doz hem süre parametrelerinden etkilenir biçimde gerçekleştiğini gözlemledik.

24 saatlik (A1 grubu) kontrol grubundaki yüksek apoptotik değerden sonra görülen azalma (48 saatte, A2 grubu) bir kısım hücrenin hücre sikluslarının sonu gereği apoptoza kendiliğinden gittiği ve geriye hücre siklusunun farklı evrelerindeki hücrelerin kaldığı ve 72 saatlik kontrol gruplarındaki (A3 grubu) apoptotik artış hücre döngüsünün sonu gereği hücrelerin zaten ölüme doğal şekilde gittikleri şeklinde yorumlandı. Apoptoza sadece zaman yönünden baktığımızda gözlemlenen apoptotik değerlerin en yüksek dozda en yüksek değerlere ulaştığı görüldü. 50 µg /ml de 24. (B1 grubu) ve 48. (B2 grubu) saatler sonundaki apoptoz yakın değerlerde olup 72. saate gelince (B3 grubu) 3 kat birden artmaktadır. Bu değerlere bakarak zamanın kritik bir süreden sonra yüksek dozda kuvvetli bir şekilde etki ettiğini ve hücreleri apoptoza indüklediğini söyleyebiliriz. 100 µg /ml doz ile 48. saatin (C2 grubu) sonundaki gözlem sonuçları bize dozun süreye göre daha etkin apoptotik öneme sahip olduğunu düşündürdü.

Doz ve zamanın belli bir apoptotik değere gelene kadar birincil ve benzer şiddette apoptotik indükleyiciler oldukları ama en yüksek dozda, belli bir süreden sonra artmış sürenin apoptozu çok fazla etkilemediğini ortaya koyduk.

Mikroskopik gözlemlere ek olarak verilerin ANOVA testinde yorumlanması sonunda ulaştığımız sonuçlar gözlemlerimizi matematiksel olarak destekler yönde olmuştur.

9. TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimim ve tez çalışmam süresince bana sağladığı akademik desteği, yakın ilgisi ve tüm emekleri için hocam ve tez danışmanım sayın Prof. Dr. Tuncay ALTUĞ`a çok teşekkür ederim.

Hücrelerin temini, önerileri ve güleryüzüyle katkılarından dolayı Doç. Dr. Meral KOYUTÜRK`e teşekkür ederim. Tezimin her aşamasına katkıları, önerileri ve paylaştığı tecrübeleri için Dr. Elif İlkey TAŞKIN`a teşekkür ederim. Sabrı, deneyimi ve sonsuz desteği için teşekkürün yetmeyeceği Melike ERSÖZ`e en içten teşekkürlerimi sunarım. Makale ve bilimsel kaynaklar için Andrew Richard BOORD`a, her gerektiğinde yardımına koşan Enstitü Sekreterimiz İlknur KARAOSMANOĞLU`na, zamanı ve desteği için Öğretim Görevlisi Zeynep Mine COŞKUN`a, dostlukları ve yardımları için Yüksek Lisans arkadaşlarım Seher Şule YILDIRIM ve Tuğba TARHAN`a teşekkür ederim

Eğitimim boyunca her an yanımda olan, maddi-manevi desteğini hiç eksik etmeyen aileme çok teşekkür ederim.

10. KAYNAKLAR

1. Garbisa S, Sartor L, Biggin S, Salvato B, Benelli R, Albini A. Tumor gelatinases and invasion inhibited by the green tea flavanol epigallocatechin-3-gallate. *Cancer*. 2001, 91:822-832.
2. Graham H. Green tea composition, consumption, and polyphenol chemistry. *Prev Med*. 1992, 21:334-350.
3. <http://www.caykur.gov.tr/detay.aspx?ID=9862>
4. Khan N, Mukhtar H. Tea polyphenols for health promotion. *Life Sci*. 2007, 81:519–533.
5. Graham C, Cloughesy F. Brain tumor treatment: chemotherapy and other new developments. *Semin Oncol Nurs*. 2004, 20:260-272.
6. Benda P, Someda K, Messer J, Sweet WH. Morphological and immunochemical studies of rat glial tumors and clonal strains propagated in culture. *J Neurosurg*. 1971, 34:310-323.
7. www.beyincerrahisi.net, Doç. Dr. Türker Kılıç'ın web sitesi.
8. Watanabe H, Kobayashi A, Yamamoto T, Suzuki S, Hayashi H, Yamazaki N. Alterations of human erythrocyte membrane fluidity by oxygen-derived free radicals and calcium. *Free Radic Biol Med*. 1990, 8:507-514.
9. Mepur H, Ravindranath, Thiruverkadu S, Saravanan, Clarence C, Monteclaro, Naftali Presser, Xing Ye, Senthamil R, Selvan and Stanley Brosman. Epicatechins Purified from Green Tea (*Camellia sinensis*) Differentially Suppress Growth of Gender-Dependent Human Cancer Cell Lines. *Advance Access Publication*. 2006, 3:237–247.
10. www.plants.usda.gov/java/profile?symbol=CASI16
11. Paul D, Stapleton, Saroj S, Yukihiro H, Peter W. T. Potentiation of Catechin Gallate-Mediated Sensitization of *Staphylococcus aureus* to Oxacillin by Nongalloylated Catechins. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006, 50:752–755.
12. <http://www.rsc.org/>
13. Paschka AG, Butler R, Young CY. Induction of apoptosis in prostate cancer cell lines by the green tea component, epigallocatechin-3-gallate. *Cancer Lett*. 1998, 130:1-7.

14. Gupta S, Hastak K, Afaq F, Ahmad N, Mukhtar H. Essential role of caspases in epigallocatechin-3-gallate-mediated inhibition of nuclear factor kappa B and induction of apoptosis. *Oncogene*. 2004, 23:2507-2522.
15. Mittal A, Pate M. S, Wylie R. C, Tollefsbol T. O, Katiyar S. K. EGCG down-regulates telomerase in human breast carcinoma MCF-7 cells ,leading to suppression of cell viability and induction of apoptosis. *Int J Oncol*. 2004, 24:703-710.
16. Nihal M, Ahmad N, Mukhtar H, Wood G. S. Antiproliferative and proapoptotic effects of epigallocatechin-3-gallate on human melanoma : possible implications for the chemoprevention of melanoma. *Int J Cancer*. 2005, 114:513-521.
17. Quanungo S, Das M, Haldar S, Basu A. Epigallocatechin-3-gallate induces mitochondrial membrane depolarization and caspase-dependent apoptosis in pancreatic cancer cells. *Carcinogenesis*. 2005, 26:958-967.
18. Khan N, Afaq F, Mukhtar F. Cancer chemoprevention through dietary antioxidants: progress and promise. *Anti-oxid Redox Signal*. 2007, 10:475–510.
19. Kuroda Y, Hara Y. Antimutagenic and anticarcinogenic activity of tea polyphenols. *Mutat. Res*. 1999, 436:69-97.
20. Nakano H, Ono K. Observations on the inhibition of HIV-1 reverse transcriptase by catechins. *Biochem. J*. 1990, 29: 2841-2845.
21. Vinson J. A, Su X, Zubik P. L, Bose. Phenol Antioxidant Quantity and Quality in Foods: Fruits. *J. Agric. Food Chem*. 2001, 49:5315-5321.
22. Hagerman A. E, Carlson D. M. Recent Research Developments in Agricultural and Food Chemistry, *Phytochemical Analy*. 1998, 2:689–704.
23. Muhandiram R, Chakrabartty A, Bennick A, Wroblewski K. The molecular interaction of human salivary histatins with polyphenolic compounds. *Euro J Biochem*. 2001, 268:4384-4397.
24. Touchette N, Fogle S. Apoptosis: it chimes with mitosis. *JNIH. Res*. 1991, 3:75-78.
25. Kerr J. F. R, Wyllie A. H, Currie A. R. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. 1972, 26:239-245.
26. Cohen J. J. Apoptosis: The physiological pathway of cell death. *Hosp Pract*. 1993, 15:35-43.
27. Cohen J. J. Apoptosis. *Immunol Today*. 1993, 14:126-130.

28. Nazmi G, Kamil K, Emine K. New discoveries in the mechanisms of apoptosis and cell survival and novel potential therapeutic strategies. *Turk Kardiyol Dern Ars.* 2008, 36:120-130.
29. <http://www.tkd.org.tr>
30. Geoffrey M. C. and Robert E. H. *The Cell a molecular Approach.* Boston, ASM Press, 2004.
31. Bellamy C. O, Malcomson R. D, Harrison D. J, Wyllie A. H. Cell death in health and disease: The biology and regulation of apoptosis. *Cancer Biology.* 1995, 6:3-16.
32. Gerschenson L. E, Rotello R. J. Apoptosis: a different type of cell death. *FASEB J.* 1993, 6:2450-2455.
33. Earnshaw W. C. Nuclear changes in apoptosis. *Curr Opin Cell Biol.* 1995, 7:337-343.
34. Wyllie A. H. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature.* 1980, 284:555-556.
35. Balakumran A, Champbell G. A, Maslen M. T. Calcium channel blockers induce thymic apoptosis in vivo in rats. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1996, 139:122-127.
36. Lu J, Ashwell K, Ken W. S, Waite P. Advances in spinal cord injury: Role of Apoptosis. *Spine.* 2000, 25:1859-1866.
37. www.nature.com Nature Reviews, Molecular Cell Biology.
38. www20.uludag.edu.tr/~eulukaya
39. Cummings M. C, Winterford C. M, Walker N. I. Apoptosis. *Am J Surg Pathol.* 1997, 21:88-101.
40. Spencer S, Cataldo N. A, Jaffe R. B. Apoptosis in the human female reproductive tract. *Obstet Gynecol Survey.* 1996, 5:314-323.
41. Eastman A. Survival factors, intranuclear signal transduction and the activation of endonucleases in apoptosis. *Cancer Biology.* 1995, 6:45-52.
42. Majno G, Torisl A. Apoptosis oncosis and necrosis. *Am J Pathol.* 1995, 146:3-15.
43. Levison D. A, Hopvwood D. Atrophy and apoptosis in the cyclical human endometrium. *J Pathol.* 1976, 119:159-166.
44. Schwartzman R. A, Cidloski J. A. Apoptosis; the biochemistry and molecular biology of programmed cell death. *Endocrine Reviews.* 1993, 14:133-144.

45. Indrajit C, Binu T. Current concepts in apoptosis: The physiological suicide program revisited. *Cell Mol Biol Lett.* 2006, 11:506-525.
46. Salvesen G.S, Duckett C.S. IAP proteins: blocking the road to death's door. *Nat Rev. Mol. Cell Biol.* 2002, 3:401-410.
47. Deveraux Q. L, Reed J. C. IAP family proteins: suppressors of apoptosis. *Genes Dev.* 1999, 13:239-252.
48. Sato T, Irie S, Krajewski S, Reed J.C. Cloning and sequencing of a cDNA encoding the rat Bcl2 protein. *Gene* 1994, 140:291-292.
49. Burlacu A. Regulation of apoptosis by Bcl-2 family proteins. *J Cel Mol Med.* 2003, 7:249-257.
50. Griffiths G.J, Dubrez L, Morgan C.P, Jones N. A, Whitehouse J, Corfe B. M, Dive C, Hickman J. A. Cell damage-induced conformational changes of the pro-apoptotic protein Bak in-vivo precede the onset of apoptosis. *J Cell Biol.* 1999, 144:903-914.
51. Erster S, Moll U. M. Stress induced p53 runs a transcription-independent death program. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005, 331:843-850.
52. Aggarwal B. B. Tumor necrosis factor receptor associated signalling molecules and their role in activation of apoptosis, JNK and NF-kB. *Ann Rheum Dis.* 2000, 59:6-16.
53. Chowdhury I, Tharakan B, Bhat G. K. Current concepts in apoptosis: The physiological suicide program revisited. *Cell Mol Biol Lett.* 2006, 11:506-525.
54. Huerta S, Goulet E. J, Yopez S, Livingston E. H. Screening and Detection of Apoptosis. *J Surg Res.* 2007, 139:143-156.
55. Hung R. W. Y, Chow A. W. Dissecting the "end game": clinical relevance, molecular mechanisms and laboratory assesment of apoptosis. *Clin Invest Med.* 2004, 27:324-44.
56. Barnes P. J. Alveolar Macrophages as orchestrators of COPD. *J COPD.* 2004, 1:59-70.
57. Kuhn C, Yu SH, Chraplyvy M, Linder H. E, Senior R. M. The induction of emphysema with elastase II. Changes in connective tissue. *Lab Invest.* 1976, 34:372-380.
58. Öktem S, Özhan M. H, Özol D. Apoptozisin Önemi. *Toraks Dergisi* 2001, 2:91-95.
59. Chemicon ApopTag Plus Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit User Manual
60. Barnes P. J, Shapiro S. D, Pauwels R. A. Chronic obstructive pulmonary disease: molecular and cellular mechanisms. *Eur Respir J.* 2003, 22:672-688.
61. Halliwell B, Gutteridge J. M. C. Free Radicals in Biology and Medicine, Oxford, UK, Clarendon Press, 2007.

62. Thiele J. J, Schroeter C, Hsieh S. N, Podda M, Packer L. The Antioxidant Network of the Stratum Corneum. *Curr Prob. Dermatol.* 2001, 29:26–42.
63. D'Archivio M, Santangelo C, Scazzochio B, Vari R, Filesi C, Masella R, Giovannini C. Modulatory effects of Polyphenols on Apoptosis Induction:Relevance for cancer Prevention. *Int J Mol Sci.* 2008, 9:213-228.
64. <http://ntp.niehs.nih.gov/>
65. Shimizu M, Deguchi A, Lim J. T, Moriwaki H, Kopelovich L, Weinstein I. B. Epigallocatechin gallate and polyphenon E inhibit growth and activation of the epidermal growth factor receptor and human epidermal growth factor receptor-2 signaling pathways in human colon cancer cells. *Clin Cancer Res.* 2005, 11: 2735-46.
66. Selvendiran K, Koga H, Ueno T, Yoshida T, Maeyama M, Torimura T, Yano H, Kojiro M, Sata M. Luteolin promotes degradation in signal transducer and activator of transcription 3 in human hepatoma cells: an implication for the antitumor potential of flavonoids. *Cancer Res.* 2006, 66:4826-4834.
67. Michels G, Watjen W, Niering P, Steffan B, Thi Q. H, Chovolou Y, Kampkotter A, Bast A, Proksch P, Kahl R. Pro-apoptotic effects of the flavonoid luteolin in rat H4IIE cells. *Toxicology.* 2005, 206:337-48.
68. Lee H. J, Wang C. J, Kuo H. C, Chou F. P, Jean L. F, Tseng T. H. Induction apoptosis of luteolin in human hepatoma HepG2 cells involving mitochondria translocation of Bax/Bak and activation of JNK. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2005, 203:124-31.
69. Kuo P. L, Lin C. C. Green tea constituent epigallocatechin-3-gallate inhibits Hep G2 cell proliferation and induces apoptosis through p53-dependent and Fas-mediated pathways. *J Biomed Sci.* 2003, 10:219-27.
70. Gong L, Li Y, Nedeljkovic-Kurepa A. Sarkar F. H. Inactivation of NF-kappaB by genistein is mediated via Akt signaling pathway in breast cancer cells. *Oncogene.* 2003, 22:4702-4709.
71. Soobrattee T, Bahorun O, Aruoma I. Chemopreventive actions of polyphenolic compounds in cancer. *Biofactors.* 2006, 27:19–35.
72. Galati G, O'Brien P. J. Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: significance for their chemopreventive and anticancer properties. *Free Radic Biol Med.* 2004, 37: 287–303.

73. Dirks P. B, Rutka J. T. Current concepts in neuro-oncology: the cell cycle--a review. *Neurosurgery*. 1997, 40:1013-1015.
74. Fujiki H, Saganuma M, Okabe S, Sueoka N, Komori A, Sueoka E, Kozu T, Tada Y, Suga K, Imai K, Nakachi K. Cancer inhibition by green tea. *Mutat Res*. 1998, 402:307-310.
75. Yamene T, Nakatani H, Kikuoka N, Matsumoto H, Iwata Y, Kitao Y, Oya, Takahashi T. Inhibitory effects and toxicity of green tea polyphenols for gastrointestinal carcinogenesis. *Cancer Supplement*. 1996, 15:1162-1167.
76. Gao YT, McLaughlin JK, Blot WJ, Ji BT, Dai Q, Fraumeni JF Jr. Reduced risk of esophageal cancer associated with green tea consumption. *J Natl Cancer Inst*. 1994, 86:885-858.
77. Kono S, Ikeda M, Tokudome S, Kuratsune M. A case-control study of gastric cancer and diet in northern Kyushu, Japan. *Jpn Cancer Res*. 1998, 79:1067-1074.
78. Jankun J, Selman SH, Swiercz R. Why drinking green tea could prevent cancer. *Nature*. 1997, 387:561.
79. Saganuma M, Okabe S, Sueoka E, Lida N, Komori A, Kim S, Fujiki H. A new process of cancer prevention mediated through inhibition of tumor necrosis factor expression. *Cancer Res*. 1996, 56:3711-3715.
80. Nasani I, Seimiya H, Tsuruo T. Telomerase inhibition, telomerase shortening, and senescence of cancer cells by tea catechins. *Biochem Biophys Res Commun* 1998, 249:391-396.
81. Dong Z, Ma W, Huang C, Yang C. S. Inhibition of tumor promoter-induced activator protein 1 activation and cell transformation by tea polyphenols, epigallocatechin gallate and theaflavins. *Cancer Res*. 1997, 57:4414-4419.
82. Ahmad N, Feyes DK, Nieminen Agarwal N, Mukhtar H. Green tea constituent epigallocatechin-3-gallate and induction of apoptosis and cell cycle arrest in human carcinoma cells. *J Natl Cancer Inst*. 1997, 89:1881-1886.
83. Katdore M, Osborne MP, Telang NT. Inhibition of aberrant proliferation and induction of apoptosis in pre-neoplastic human mammary epithelial cells by natural phytochemicals. *Oncol Rep*. 1998, 5:311-315.

- 84.** Hibasami H, Komiya T, Achiwa Y, Ohnishi K , Kojima T, Nakanishi K, Akashi K, Hara Y. Induction of apoptosis in human stomach cancer cells by green tea catechins. *Oncol Rep.* 1998, 5:527-529.
- 85.** Hirose M, Hoshiya T, Akagi K, Takahashi S, Hara Y, Ito N. Effects of green tea catechins in a rat multiorgan carcinogenesis model. *Carcinogenesis.* 1993, 14:1549-1553.
- 86.** Katiyar SK, Mukhtar H. Tea antioksidants in cancer chemoprevention. *J Cell Biochem suppl.* 1997, 27:59-67.
- 87.** Chen ZP, Schell JB, Ho CT, Chen KY.. Green tea epigallocatechin gallate shows a pronounced growth inhibitory effect on cancerous cells but not on their normal counterparts. *Cancer Lett.* 1998, 129:173-179.
- 88.** Yokoyama S, Hirano H, Wakimaru N, Sarker KP, Kuratsu J. Inhibitory effect of epigallocatechin-gallate on brain tumor cell lines in vitro. *Neuro Oncology.* 2001, 3:22-28.
- 89.** Lei-Chwen L, Meng-Nan W, Ting-Yu T, Sung J, Tsai T. Pharmacokinetics of Epigallocatechin-3-gallate in conscious and freely moving rats and its brain regional distribution. *J Agric Food Chem.* 2007, 55:1517–1524.